THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS
LIBRARY

589.95
D72p2
v.1

BACTERIOLOGY

LIBRARY
UNIVERSITY OF ILLINOIS
URBANA

Bibliothèque du Doctorat en Médecine

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DE

A. GILBERT & **L. FOURNIER**

Professeur à la Faculté de médecine de Paris,
Médecin de l'Hôtel-Dieu,
Membre de l'Académie de médecine.

Ancien chef de clinique de la Faculté
de médecine de Paris,
Médecin de l'hôpital Cochin.

1909-1921, 30 volumes in-8 de 400 à 800 pages, avec figures.

BIBLIOTHÈQUE DU DOCTORAT EN MÉDECINE

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DE

A. GILBERT & L. FOURNIER

Tous ces volumes se vendent brochés et cartonnés.
Pour le cartonnage, ajouter 6 francs au prix du volume broché.

PREMIER EXAMEN

ANATOMIE. — DISSECTION. — HISTOLOGIE. — ÉLÉMENTS DE PATHOLOGIE GÉNÉRALE.

Précis d'Anatomie, par le Dr *GRÉGOIRE*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris. 3 vol. petit in-8.

Précis d'Histologie, 1 vol. petit in-8 de 500 pages.

Le premier Livre de Médecine, par le Dr *ACHARD*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Beaujon. *2e édit.*, 1921, 1 vol. in-8 de 352 pages avec 214 figures noires et coloriées..... **16** fr.

DEUXIÈME EXAMEN

PHYSIOLOGIE. — PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES.

Précis de Physiologie. 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures.

Précis de Physique médicale, par le Dr *André BROCA*, professeur à la Faculté de médecine de Paris. *3e édit.*, 1920, 1 vol. petit in-8 de 650 pages avec 379 figures..... **16** fr.

Précis de Chimie biologique, par le Dr *DESGREZ*, professeur à la Faculté de médecine de Paris. 1921, 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures. **16** fr.

TROISIÈME EXAMEN

I. — MÉDECINE OPÉRATOIRE. — ANATOMIE TOPOGRAPHIQUE.

Précis de Médecine opératoire, par le Dr *LECÈNE*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris. *2e édit.*, 1921, 1 vol. petit in-8 de 320 pages avec 321 figures..... **18** fr.

Précis d'Anatomie topographique, par le Dr *SOULIÉ*, professeur à la Faculté de médecine de Toulouse. 1911, 1 vol. petit in-8 de 720 pages, avec 245 figures noires et coloriées..... **18** fr.

TROISIÈME EXAMEN (Suite)

II. — PATHOLOGIE EXTERNE. — OBSTÉTRIQUE.

Précis de Pathologie externe, par les Drs *FAURE*, *ALGLAVE*, *DESMAREST*, *OKINCZYC*, *OMBRÉDANNE*, *SCHWARTZ*, *MATHIEU*. 1909-1921, 5 vol. petit in-8 de chacun 500 pages avec figures coloriées..... **63** fr.

Chaque volume se vend séparément.

I. **Pathologie chirurgicale générale**, par le Dr *J.-L. FAURE*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien de l'hôpital Broca ; *ALGLAVE* et *DESMAREST*, professeurs agrégés à la Faculté, chirurgiens des hôpitaux de Paris. 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures.

II. **Tête, Cou, Rachis**, par le Dr *OKINCZYC*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux. 1916, 1 vol. petit in-8 de 400 pages avec figures noires et coloriées..... **12** fr.

III. **Poitrine et Abdomen**, par le Dr *OMBRÉDANNE*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux. 1909, 1 vol. petit in-8 de 400 pages avec 180 figures noires et coloriées..... **12** fr.

IV. **Organes génito-urinaires**, par les Drs *A. SCHWARTZ* et *P. MATHIEU*, professeurs agrégés à la Faculté de médecine de Paris, chirurgiens des hôpitaux de Paris. 1912, 1 vol. petit in-8 de 400 pages avec figures noires et coloriées..... **12** fr.

V. **Membres**, par le Dr *P. MATHIEU*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris. 1921, 1 vol. petit in-8, de 350 pages avec figures noires et coloriées..... **15** fr.

Précis d'Obstétrique, par le Dr *FABRE*, professeur à la Faculté de médecine de Lyon. *3e édit.*, 1921, 1 vol. petit in-8 de 756 pages avec 466 fig. *Sous presse.*

III. — PATHOLOGIE GÉNÉRALE. — PARASITOLOGIE. — MICROBIOLOGIE. PATHOLOGIE INTERNE. — ANATOMIE PATHOLOGIQUE.

Précis de Pathologie générale, par les Drs *H. CLAUDE* et *Jean CAMUS*, professeurs agrégés à la Faculté de médecine de Paris, médecins des hôpitaux. *2e édit.*, 1921, 1 vol. petit in-8 de 680 pages avec figures noires et color. *Sous presse.*

Précis de Parasitologie, par le Dr *GUIART*, professeur à la Faculté de médecine de Lyon. *2e édit.*, 1921, 1 vol. petit in-8 de 610 pages avec 549 figures. *Sous presse.*

Précis de Bactériologie, par les Drs *DOPTER* et *SACQUÉPÉE*, professeurs à l'École du Val-de-Grâce. *2e édit.*, 1920, 2 vol. petit in-8 de 900 pages avec 389 figures..... **40** fr.

Tome I. **Technique générale et technique spéciale.** 1 vol..... **20** fr.

Tome II. **Technique spéciale**..... *Sous presse.*

Précis de Pathologie interne, par les Drs *GILBERT*, *WIDAL*, *CASTAIGNE*, *CHABROL*, *H. CLAUDE*, *DOPTER*, *DUMONT*, *M. GARNIER*, *JOMIER*, *JOSUÉ*, *LOEPER*, *RATHERY*, *RIBIERRE*, *PAILLARD*, *PAISSEAU*, *SAINT-GIRONS*. 5 vol. petit in-8 de 500 à 800 pages chacun avec figures.

Chaque volume se vend séparément.

I. **Maladies infectieuses et diathésiques, Intoxications, Maladies du sang**, par les Drs *DOPTER*, professeur au Val-de-Grâce ; *RATHERY*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux ; *RIBIERRE*, professeur agrégé à la Faculté de Paris, médecin des hôpitaux de Paris. 1912, 1 vol. petit in-8 de 880 pages avec figures noires et coloriées..... **16** fr.

II. **Maladies de l'appareil respiratoire et de l'appareil circulatoire**, par les Drs *LOEPER*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris ; *JOSUÉ*, médecin des hôpitaux de Paris ; *PAISSEAU*, médecin des hôpitaux de Paris ; *PAILLARD*, ancien interne des hôpitaux de Paris. 1914, 1 vol. petit in-8 de 748 pages avec 175 figures noires et color.. **16** fr.

III et IV. **Maladies du système nerveux et des glandes à sécrétion interne**, par les Drs *CLAUDE* et *GARNIER*, professeurs agrégés à la Faculté de médecine de Paris, médecins des hôpitaux de Paris. 1921. 2 vol. petit in-8, ensemble 800 pages, avec figures... **40** fr.

V. **Maladies de l'appareil digestif et de l'appareil urinaire**, par les Drs *GILBERT*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine ; *CHABROL*, *DUMONT*, *JOMIER*, *SAINT-GIRONS*, *WIDAL*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie des sciences et de l'Académie de médecine ; *CASTAIGNE*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris. 1 vol. petit in-8, avec figures.

Précis d'Anatomie pathologique, par les Drs *ACHARD*, professeur, et *LOEPER*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris. *2e édit.*. 1916, 1 vol. petit in-8 de 600 pages avec 332 figures et 2 planches coloriées..... **17** fr.

BIBLIOTHÈQUE DU DOCTORAT EN MÉDECINE

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DE

A. GILBERT & L. FOURNIER

QUATRIÈME EXAMEN

THÉRAPEUTIQUE. — MATIÈRE MÉDICALE. — PHARMACOLOGIE. HYGIÈNE. — MÉDECINE LÉGALE.

Précis de Thérapeutique, par les Drs *P. CARNOT* et *RATHERY*, professeur et agrégé de thérapeutique à la Faculté de médecine de Paris, médecins des hôpitaux. 1921, 1 vol. petit in-8 de 500 pages.

Précis de Matière médicale et de Pharmacologie. 1 vol. petit in-8 de 500 pages.

Précis d'Hygiène, par le Dr *MACAIGNE*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris. *2e édit.*, 1921, 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures.. **16** fr.

Précis de Médecine légale, par le Dr *BALTHAZARD*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine, *3e édit.*, 1921, 1 vol. petit in-8 de 640 pages avec 2 planches coloriées et 139 figures..... **20** fr.

CINQUIÈME EXAMEN

CLINIQUES.

Précis des Maladies des Enfants, par le Dr *APERT*, médecin de l'hôpital des Enfants-Malades. Introduction sur l'exploration clinique dans la première enfance, par le Pr *MARFAN*. *3e édit.*, 1920, 1 vol. petit in-8 de 550 pages avec 90 fig..... **16** fr.

Précis d'Ophtalmologie, par le Dr *TERRIEN*, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, ophtalmologiste des hôpitaux de Paris. Préface du Pr *DE LAPERSONNE*. *2e édit.*, 1914, 1 vol. petit in-8 de 600 pages avec 320 fig. et 4 pl. col. **16** fr.

Précis de Laryngologie, Otologie, Rhinologie, Stomatologie, par le Dr *SÉBILEAU*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, oto-rhino-laryngologiste de l'hôpital Lariboisière. 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures.

Précis de Dermatologie et Syphiligraphie, par le Dr *JEANSELME*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Saint-Louis, et le Dr *SÉZARY*, médecin des hôpitaux de Paris. 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures.

Précis de Psychiatrie, par les Drs *DUPRÉ*, professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'asile Sainte-Anne, et *Paul CAMUS*, médecin djoint de l'hospice de Bicêtre. 1 vol. petit in-8 de 500 pages avec figures.

BIBLIOTHÈQUE DU DOCTORAT EN MÉDECINE

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DE

A. GILBERT & L. FOURNIER

PRÉCIS

DE

BACTÉRIOLOGIE

*

LISTE DES COLLABORATEURS

ACHARD...	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Beaujon, membre de l'Académie de médecine.
ALGLAVE.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
APERT	Médecin de l'hôpital des Enfants-Malades.
BALTHAZARD.....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine.
BROCA (André).....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris.
CAMUS (Jean).....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux.
CAMUS (Paul)	Médecin adjoint des Asiles et de Bicêtre.
CARNOT (P.).....	Professeur de thérapeutique à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Beaujon.
CASTAIGNE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital de la Charité.
CHABROL...	Chef de clinique de la Faculté de médecine de Paris.
CLAUDE (H.).	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Saint-Antoine.
DESGREZ.....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine.
DESMAREST.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
DOPTER.....	Professeur à l'Ecole du Val-de-Grâce, membre de l'Académie de médecine.
DUMONT.....	Interne des hôpitaux de Paris.
DUPRÉ.....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'asile Sainte-Anne, membre de l'Académie de médecine.
FABRE	Professeur à la Faculté de médecine de Lyon.
FAURE (J.-L.)..... ...	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien de l'hôpital Broca.
GARNIER (M.).....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Lariboisière.
GILBERT.....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'Hôtel-Dieu, membre de l'Académie de médecine.
GRÉGOIRE..	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
GUIART.....	Professeur à la Faculté de médecine de Lyon.
JEANSELME	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Saint-Louis, membre de l'Académie de médecine.
JOMIER.....	Chef de clinique à la Faculté de médecine de Paris.
JOSU	Médecin de l'hôpital de la Pitié.
LECÈNE.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
LOEPER	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
MACAIGNE	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
MATHIEU.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
OKINCZYC.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
OMBRÉDANNE...	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien de l'hôpital Bretonneau.
PAILLARD.....	Ancien interne des hôpitaux de Paris.
PAISSEAU..... ..	Médecin des hôpitaux de Paris.
RATHERY.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
RIBIERRE.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Tenon.
SACQUÉPÉE.....	Professeur à l'Ecole du Val-de-Grâce.
SAINT-GIRONS... ...	Chef de laboratoire à la Faculté de médecine de Paris.
SCHWARTZ A.)... ...	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux de Paris.
SÉBILEAU.....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, oto-rhinolaryngologiste de l'hôpital Lariboisière.
SÉZARY.....	Médecin des hôpitaux de Paris.
SOULI	Professeur à la Faculté de médecine de Toulouse.
TERRIEN.....	Professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, ophtalmologiste de l'hôpital Beaujon.
WIDAL.....	Professeur à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Cochin, membre de l'Institut et de l'Académie de médecine.

BIBLIOTHÈQUE du DOCTORAT en MÉDECINE

PUBLIÉE SOUS LA DIRECTION DE

A. GILBERT & **L. FOURNIER**

Professeur à la Faculté de médecine de Paris,
Médecin de l'Hôtel-Dieu,
Membre de l'Académie de médecine.

Ancien Chef de clinique
de la Faculté,
Médecin de l'hôpital Cochin.

PRÉCIS

DE

BACTÉRIOLOGIE

PAR

Ch. DOPTER et SACQUÉPÉE

PROFESSEURS A L'ÉCOLE DU VAL-DE-GRACE

DEUXIÈME ÉDITION ENTIÈREMENT REFONDUE

*

Avec 198 figures noires et coloriées.

PARIS
LIBRAIRIE J.-B. BAILLIÈRE ET FILS
19, RUE HAUTEFEUILLE, 19

1921

Tous droits réservés.

58335
D72p2

PRÉFACE

La somme des connaissances exigées aujourd'hui de l'étudiant en médecine pour l'obtention du titre de docteur est considérable ; elle s'accroît chaque jour du fait des progrès chaque jour accomplis dans le domaine médical. Aussi, de plus en plus, l'étudiant a-t-il besoin, à côté des cours oraux et des travaux pratiques qu'il trouve à l'école, de leur auxiliaire précieux et indispensable, le livre.

La nécessité, pour l'enseignement médical, d'ordonner, de condenser, de mettre au point les innombrables travaux de ces dernières années est la raison d'être du prodigieux essor de la librairie médicale actuelle, qui nous a donné, avec les gros traités de médecine, plusieurs collections très importantes.

Mais il n'existe pas, nous a-t-il semblé, une collection d'ouvrages correspondant au programme imposé aux étudiants en médecine. Certes, il n'est pas inutile aux jeunes de butiner dans le vaste champ des productions médicales et de faire eux-mêmes leur apprentissage dans l'art de choisir la meilleure nourriture intellectuelle ; mais encore faut-il qu'ils aient eu tout d'abord et qu'ils conservent toujours à leur disposition et à leur portée une alimentation rationnelle et choisie.

D'ailleurs, le temps qui leur est dévolu pour acquérir la somme des connaissances que l'on exige d'eux, — à juste

raison du reste, — est relativement très peu considérable. En quelques années, ils passent de l'état de collégiens à l'état d'hommes appelés à jouer un rôle social considérable. Rien de ce qui peut leur faciliter cette transformation prodigieuse, rien en particulier de ce qui peut les doter plus vite des connaissances indispensables ne doit être négligé.

Voilà pourquoi nous avons entrepris de présenter à ceux qui se destinent à la profession médicale une collection d'ouvrages qui fussent comme le développement naturel des programmes imposés par la Faculté. Après avoir dressé le plan détaillé de la « Bibliothèque du Doctorat », nous nous sommes efforcés de trouver, pour chaque partie, le collaborateur le plus nettement désigné, celui qui, de l'aveu universel, parût le plus capable de mettre au point la somme des connaissances que doit posséder l'étudiant. Nous avons trouvé dans le corps enseignant de la Faculté de Paris la plupart de ces précieux collaborateurs déjà tout désignés, par leur enseignement oral même, pour assumer la tâche non moins méritoire et glorieuse de l'enseignement écrit. Nous tenons à les remercier bien vivement de l'aide qu'ils nous ont apportée dans l'accomplissement de l'œuvre entreprise ; grâce aux services qu'elle rendra certainement, ils auront contribué à soutenir l'antique renommée de l'École de Paris et à maintenir l'éclat de son enseignement.

La « Bibliothèque du Doctorat » comprendra trente volumes ; les étudiants en médecine y trouveront développées toutes les matières de leur programme. Pour les préparer aux difficultés de la clinique, nous avons insisté pour que les chapitres de sémiologie fussent suffisamment développés en médecine, en chirurgie, en obstétrique. Nous avons enfin attribué à quelques spécialités, ophtalmologie, oto-rhino-laryngologie, psychiatrie, une place relativement assez considérable, puisqu'un volume

tout entier a été consacré à chacune d'elles; mais l'importance croissante de ces spécialités, le fait qu'elles comportent soit des examens, soit des concours spéciaux, justifiaient, nous semble-t-il, une semblable détermination.

Nous ne saurions terminer cette préface sans remercier MM. J.-B. Baillière des efforts qu'ils ont faits pour que la « Bibliothèque du Doctorat » se présentât sous un aspect agréable, capable de satisfaire les bibliophiles les plus délicats, et pour qu'aucun reproche ne pût se justifier tant au point de vue de l'impression du texte que de la reproduction des figures.

A. Gilbert et L. Fournier.

PRÉCIS

DE

BACTÉRIOLOGIE

CHAPITRE PREMIER

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES MICROBES

On entend par microbes des êtres vivants, ayant une structure élémentaire et des dimensions si minimes qu'ils ne peuvent être vus qu'au microscope. Certains d'entre eux même échappent encore à l'investigation microscopique : il s'agit d'un groupe d'organismes dits invisibles, dont la nature microbienne ne peut être démontrée que par divers procédés de laboratoire. Quoi qu'il en soit, les microbes sont les êtres les plus simples que l'on rencontre dans la nature.

PLACE DES MICROBES PARMI LES ÊTRES VIVANTS

La plupart des premiers observateurs avaient été frappés par la mobilité des germes des fermentations : on vit ainsi Müller, Ehrenberg, Dujardin, affirmer qu'ils devaient, par là même, être rattachés au règne animal, au même titre que les Infusoires. Dujardin basait son affirmation sur l'absence de chlorophylle dans ces êtres vivants, qui devaient ainsi s'éloigner du règne végétal.

Davaine, en étudiant la bactéridie charbonneuse, observa cependant qu'elle était immobile : on sait depuis que beaucoup d'autres microbes présentent la même propriété ; d'ailleurs, la mobilité est un caractère que l'on constate chez certains végétaux inférieurs au cours de certaines phases de leur existence : c'est le cas des Algues, des Oscillariées, des Diatomées. Enfin il existe d'autre part des champignons dénués de chlorophylle.

Davaine, en effet, assimilait les bactéries à des Algues, voisines des Oscillaires. Pasteur les a longtemps considérées comme des Infusoires. Ce fut aussi l'opinion de Balbiani, Künstler, Bütschli.

Actuellement, on a tendance à les considérer comme des végétaux inférieurs ; on a été frappé, en effet, de la ressemblance de certaines bactéries avec certaines Algues. Parmi ces dernières, il existe des Algues vertes, constituées par un protoplasma incolore, un noyau et une membrane, mais le protoplasma contient des granulations, ou chromatophores, sur lesquelles se fixe un pigment chlorophyllien. Mais on connaît les *Algues bleues* ou *Cyanophycées* ou *Phycochromacées*, dépourvues de noyau, et dont le protoplasma contient de la chlorophylle et de la phycocyanine, substance soluble dans l'eau, dissoute dans le contenu cellulaire. Elles présentent des formes analogues à des cocci isolés ou disposés en chaînettes ou à des bâtonnets; on leur connaît aussi des formes encapsulées et des formes spiralées. Les Cyanophycées produisent encore, comme certaines bactéries, des agglomérations en *zooglées*, représentant des formes dites palmellacées. Elles constituent en réalité la transition entre les Algues proprement dites et les bactéries.

Il est donc probable que les bactéries sont des végétaux inférieurs.

FORMES ET DIMENSIONS DES BACTÉRIES.

On connaît aux bactéries plusieurs formes :

Microcoques. — En certains cas, elles présentent une forme ronde, sphérique. On dit alors qu'il s'agit d'un *coccus*; on les nomme encore *Microcoques*. Les cocci mesurent en moyenne quelques dixièmes de μ de diamètre.

Un coccus peut se montrer à l'état isolé, ou bien il se montre sous l'aspect de *diplocoques*, quand un élément est associé à l'un de ses congénères. Le groupement peut être plus important et être constitué par une série de cocci agglomérés, figurant des sortes de grappes, par exemple le *Staphylocoque*. Parfois ils se disposent en *chaînettes*, comme les *Streptocoques*.

Lors de leur multiplication, les cocci peuvent se segmenter en deux sens perpendiculaires; on observe alors les *tétrades*, comme pour le *Tétragène*. Si la segmentation s'opère en trois sens, il s'agit alors de *Sarcines*.

En d'autres cas, les cocci, au lieu d'être ronds, sont aplatis et prennent la forme de grains de café ou de haricots regardant un de leurs congénères par leur face plane ou concave. Tel est le cas du Méningocoque et du Gonocoque.

Enfin certains cocci prennent une forme un peu ovalaire et se rapprochent ainsi des bacilles, ce sont des Cocco-bacilles. Tel le bacille de la peste. Certains cocco-bacilles sont entourés d'une capsule, comme le Pneumocoque et le Pneumobacille.

Bacilles. — Les bacilles sont des germes plus ou moins allongés : ils ont la forme de bâtonnets.

Les uns ont des extrémités rectilignes comme la bactéridie charbonneuse; chez d'autres, comme le bacille typhique, le c libacille, elles sont arrondies. Le bacille diphtérique, le bacille tétanique montrent, au contraire, des extrémités renflées. Chez d'autres, le renflement porte sur le corps même du microbe, comme dans le bacille fusiforme.

Certains auteurs distinguent dans ce groupe deux familles : l'une, famille *Bacterium*, représentée par les bâtonnets asporogènes; l'autre, famille *Bacillus*, comprenant des bâtonnets sporulés.

Ces divers bacilles se présentent en général à l'état isolé. S'ils sont groupés deux à deux, ce sont des diplobacilles. Si plusieurs éléments semblables sont placés bout à bout, ils forment de véritables chaînettes (strepto-bacilles ou même strepto-diplobacilles).

Dans le genre bacille, il faut distinguer encore plusieurs espèces :

Les *bâtonnets incurvés* en virgule, comme le Vibrion cholérique ;

Les *Spirales* ou *Spirochètes*, fins filaments présentant un nombre variable d'ondulations :

Les *bacilles ramifiés*. Dans les uns (*Cladothrix*) les ramifications sont fausses, car elles sont simplement accolées; dans les autres (*Streptothrix*), les ramifications sont vraies (fig. 1).

Fig. 1. — Streptothrix (d'après Gasparini).

La dimension des bacilles est très variable. Longs en général de quelques dixièmes de μ, ils présentent parfois une longueur de 1 μ à 1 μ, 5 ; mais leur largeur peut être plus considérable suivant les espèces et les milieux où on les fait vivre.

PLÉOMORPHISME DES BACTÉRIES.

Il est remarquable de constater que la forme d'une seule et même bactérie, contrairement à la fixi é relative de la plupart des espèces animales et végétales, est très variable.

Ainsi le *bacille diphtérique*, porté du milieu naturel où il pullule dans un milieu artificiel, devient plus court ou au contraire plus allongé; dans un même milieu artificiel, si la culture se prolonge et vieillit, il prend des formes qui le font ressembler à un coccus.

Le *Bacillus prodigiosus*, ensemencé sur les milieux alcalins, donne des cocci; réensemencé en milieu faiblement acide (acide tartrique), il se montre sous l'aspect de bacilles ou de spirales.

D'autres germes donnent, suivant le milieu où ils vivent et suivant les conditions diverses qu'on leur fait subir, des cocci, des filaments droits ou incurvés, des filaments spiralés.

Enfin, dans les cultures anciennes, dans les milieux défavorables à leur développement, les microbes prennent souvent des *formes d'involution* (fig. 2), dans lesquelles il est souvent impossible de reconnaître le germe initial; ils prennent ainsi des formes en massue, en poire, en raquette, en fuseau, etc., ou des formes ramifiées.

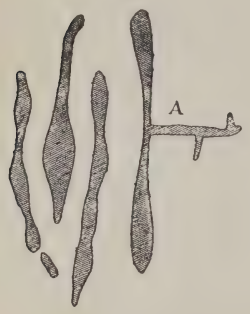

Fig. 2. — Formes d'involution.

Cette notion du pléomorphisme des bactéries n'a pas été admise sans conteste.

Nægeli, qui avait observé cette mutabilité souvent extraordinaire, en avait conclu qu'il ne pouvait distinguer dans les bactéries ni espèces, ni familles, ni genres, et qu'un germe peut, tour à tour, suivant les conditions où il se trouve, être ferment lactique, acétique, butyrique. En revêtant toutes les formes, il pouvait remplir plusieurs fonctions, et les germes pathogènes produire toutes les infections. Il en arrivait à la négation de la spécificité.

Koch reprochait aux partisans de cette théorie d'avoir opéré sur des cultures impures, où des bactéries différentes se trouvaient mélangées. En réalité, même dans les cultures pures, ces mutations se rencontrent : Kurth l'a démontré en mettant en évidence le pléomorphisme avec le *Bacterium Zopfii*.

Ces variations dues au pléomorphisme ne peuvent influencer la spécificité; d'ailleurs, elles sont le plus souvent difficiles à fixer. Ainsi le *Bacillus prodigiosus*, cultivé à 37°,5, ne produit plus son rouge habituel; si, après trente-cinq générations obtenues à cette température, on le reporte à 22°, son pouvoir antérieur reparaît. Des observations identiques ont été faites sur le Bacille pyocyanique, qui, sous l'influence d'antiseptiques, prend un

aspect filamenteux, spiralé, etc.; reporté dans un milieu normal, il reprend sa forme habituelle.

STRUCTURE.

L'examen microscopique le plus approfondi des bactéries les plus souvent observées renseigne très mal sur la structure de ces microorganismes : elles apparaissent comme des corps protoplasmiques, habituellement homogènes. On ne peut, en réalité, obtenir de données précises que sur certaines espèces de grandes dimensions, et encore faut-il parfois user d'artifices de préparation, de divers réactifs, de fixateurs qui donnent des renseignements utiles. On a ainsi pu constater que les bactéries étaient des cellules constituées par une masse protoplasmique, entourée d'une membrane d'enveloppe; la question du noyau est encore discutée.

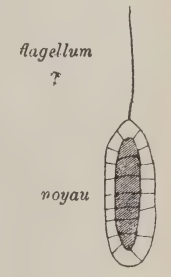

Fig. 3. — Bactérie avec noyau (d'après Bütschli).

Membrane d'enveloppe. — Chez certains germes à protoplasma très finement granuleux, la membrane d'enveloppe peut s'observer directement par un simple examen à l'état frais; chez d'autres, on ne peut la distinguer qu'après rétraction du protoplasma sous l'influence de la chaleur ou de l'alcool. Pour Fischer, elle est plus nettement visible en faisant agir une solution de sel marin à 2,5 p. 100 par exemple, qui détermine de l'osmose et de la plasmolyse. La membrane se sépare alors du contenu protoplasmique et est nettement perceptible.

Les recherches de Künstler et Busquet ont permis à ces auteurs de distinguer une couche externe, d'aspect gélatineux, assez mal délimitée (*couche gélatineuse*), et une couche interne, mince, qu'ils envisagent comme la vraie membrane (*couche cuticulaire*).

La *couche gélatineuse* serait le siège d'une striation très fine et proviendrait peut-être d'une différenciation de la zone périphérique de la couche cuticulaire; elle se montre sous l'aspect d'un liséré hyalin ou d'une auréole claire.

Les *capsules* ne seraient qu'une exagération de cette couche gélatineuse; on les constate chez le pneumocoque, le pneumobacille; la bactéridie charbonneuse en est pourvue. Ces capsules ne se colorent que par les procédés spéciaux (Voy. plus loin). Elles sont plus ou moins épaisses suivant les cas; elles entourent des bactéries iso-

lées, ou bien elles enveloppent plusieurs éléments agglomérés. Elles ne se montrent en général que sur les éléments microbiens observés dans les produits pathologiques et dans les cultures en sérum liquide. Dans les autres milieux, elles sont absentes.

La *couche cuticulaire*, interne, est plus dense et d'aspect plus sombre. Schaudinn a montré sur le *Bacillus Bütschlii* qu'elle était constituée par une sorte de réseau alvéolaire.

Protoplasma. — Les colorants vitaux, tels que le rouge neutre, le vert de méthyle, etc., ont permis de reconnaître que le protoplasma bactérien ne présente pas l'homogénéité qu'une observation superficielle permet de lui attribuer. En réalité, le protoplasma est trouble et parsemé de granulations, fixant plus ou moins les matières colorantes.

D'après Künstler, Schaudinn, il présente une structure alvéolaire : réticulum granuleux très fin, emprisonnant des espaces remplis d'un liquide clair; les granulations siègent en général au niveau des nœuds des mailles de ce réseau.

Ce dernier est souvent parsemé de *vacuoles* plus ou moins volumineuses, siégeant soit au centre de l'élément, soit à ses extrémités; d'autres se montrent en chapelet. Elle sont plus fréquentes dans les bactéries provenant des vieilles cultures.

Le protoplasma est parsemé, chez certains germes, de *corpuscules métachromatiques*, qui possèdent une affinité spéciale pour les matières colorantes. On les a décrits surtout (Neisser) dans le protoplasma des bacilles diphtériques. A. Meyer les a particulièrement étudiés sous le nom de *grains de volutine* chez *Spirillum volutans*, où ils sont très nombreux. D'après lui, il ne s'agit pas de produits de dégénérescence, comme on l'a supposé, mais de produits de réserve. Fischer pense qu'ils sont constitués par une condensation de glycogène.

Noyau. — Les opinions sont très partagées sur la question de savoir si les bactéries possèdent, ou non, un noyau.

Fischer, Massart, Migula nient son existence, et prétendent que les noyaux qu'on a décrits ne sont que des vacuoles se fragmentant, en même temps que la division protoplasmique s'opère.

D'après Bütschli, frappé par la grande affinité des bactéries pour les matières colorantes, presque toute la bactérie au contraire serait constituée par de la substance nucléaire, le protoplasma se trouvant réduit à une couche extrêmement mince, appliquée contre la membrane d'enveloppe; le corps central des *Beggiatoa* (voisines des Cyanophycées) serait tout entier un noyau. D'ailleurs, pour lui, la bactérie n'a pas besoin d'une grande quantité de protoplasma pour son genre spécial de vie; elle trouve en effet

dans le milieu extérieur des aliments tout préparés, qui lui évitent l'élaboration des produits nutritifs. Elle a besoin, au contraire, pour se multiplier et pulluler, d'un noyau énorme comme les cellules embryonnaires et certaines cellules telles que les spermatozoïdes.

Enfin, pour d'autres auteurs (Weigert notamment), le noyau des bactéries n'est pas nettement individualisé : la substance chromatique existe, mais elle ne forme pas une masse limitée, agglomérée; elle est disséminée dans le protoplasma; le noyau serait donc diffus, fractionné, constituant, à vrai dire, un système *chromidial*. Cet état diffus est évident, comme l'a montré Swellengrebel, chez le *Bacillus maximus buccalis* (fig. 4), où il forme un filament spiralé; de même chez le *Spirillum gigantum*.

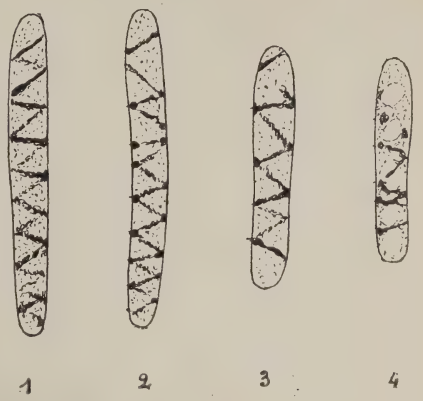

Fig. 4. — *Bacillus maximus buccalis* (Swellengrebel).

MOBILITÉ.

Un certain nombre de microbes sont mobiles : c'est un caractère qui avait frappé les premiers observateurs. D'autres, au contraire, sont complètement immobiles.

Les mouvements qu'ils présentent sont bien différents du mouvement brownien et des mouvements dus aux courants de la masse liquide dans laquelle ils sont plongés. Ils sont de plusieurs sortes :

Ils peuvent être extrêmement rapides, à tel point que le microbe traverse comme une flèche le champ de la préparation. En d'autres cas, le mouvement est lent et consiste à la fois en un mouvement d'oscillation et de translation. Parfois il s'agit d'une simple reptation, ou bien encore d'un mouvement de vrille, fréquemment observé chez les Spirochètes.

Le degré de mobilité des bactéries est conditionné par divers facteurs, parmi lesquels on compte tout d'abord la fluidité du liquide : moins le liquide est dense, plus les mouvements sont vifs.

Pour certaines bactéries, l'influence de l'oxygène est indéniable.

Il est facile de s'en rendre compte dans une goutte de culture liquide placée entre lame et lamelle. Il arrive un moment où, au centre de la préparation, les mouvements cessent, alors qu'à la périphérie, où les germes puisent de l'oxygène, ils sont encore actifs. Il en est de même de la lumière et de la chaleur.

Les mouvements que présentent certains germes sont tels qu'ils leur permettent de traverser une couche de sable, voire même un filtre de porcelaine. Cette propriété a été utilisée par Cambier (filtre Chamberland), puis Carnot et Garnier (tube contenant un quartz très fin) pour séparer les microbes mobiles de ceux qui ne le sont pas, et pour déterminer le degré de mobilité des premiers.

On a pensé que les mouvements des bactéries étaient en corrélation directe avec la présence de *cils vibratiles* s'insérant à leur surface; chez les germes dépourvus de ces organes on admet que les mouvements peuvent être déterminés par la contractilité du protoplasma microbien.

Les cils vibratiles ne sont pas visibles à l'état frais; on ne peut les mettre en évidence que par certains procédés spéciaux de coloration (Voy. plus loin). Certaines bactéries, comme le Vibrion cholérique, ne possèdent qu'un cil, placé à l'une des extrémités. Les Spirochètes en présentent soit un seul à chaque extrémité, soit plusieurs disposés en bouquet. Les bâtonnets mobiles en sont habituellement pourvus d'un grand nombre, s'insérant sur toute l'étendue du corps bactérien (Bacille typhique, Colibacille, Bacille du tétanos, etc.).

On discute encore sur la *nature* des cils vibratiles. Les uns admettent qu'ils sont une émanation de la masse protoplasmique des microbes, voire même de la couche périphérique, dépourvue de granulations et très difficile à colorer, comme les cils eux-mêmes.

D'après Van Tieghem, les cils vibratiles dépendent de la membrane d'enveloppe : c'est aussi l'opinion de Bütschli, qui, par pression, fait éclater la membrane du *Bacterium lineola*; alors que le contenu du microbe sort tout entier par l'orifice de rupture, le cil que cette bactérie possède persiste avec la membrane d'enveloppe.

CHAPITRE II

NOTIONS SOMMAIRES SUR LA PHYSIOLOGIE DES MICROBES

REPRODUCTION.

La reproduction des bactéries s'effectue, suivant les cas, les conditions d'existence et suivant certaines espèces, par deux procédés essentiels :

1° Par *scissiparité* ou simple division ;

2° Par *sporulation*.

Scissiparité. — La scissiparité n'est pas une véritable reproduction : « Le phénomène de reproduction implique en effet la formation d'individus nouveaux ; dans la division vraie, un élément, préparé par divers changements qui se sont opérés en lui, en forme deux ou plusieurs, sans qu'aucun caractère puisse faire distinguer un élément producteur d'un élément produit » (Macé).

Pour observer ces phénomènes de scissiparité, il suffit de placer une goutte de culture en bouillon entre lame et lamelle et de luter cette préparation fraîche à l'aide de paraffine pour éviter l'évaporation. Avec des microbes avides d'oxygène, il faut observer avec la chambre humide, en goutte pendante :

La division s'opère en général suivant une ligne transversale ; quand la bactérie a atteint sa longueur normale, il se forme en son milieu une cloison mince ; l'apparition de cette cloison s'accompagne d'un étranglement qui divise l'élément en deux portions égales. L'étranglement s'accentuant sépare ces deux parties, dont chacune devient une bactérie nouvelle (fig. 5 et 6).

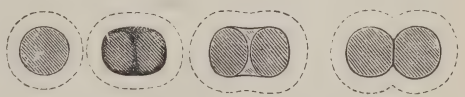

Fig. 5. — Schéma de la division des cocci (Macé).

Ces deux parties restent parfois accolées pour déterminer la formation d'éléments disposés deux à deux (*diplobacilles* ou *diplocoques*).

Le groupement peut porter sur une série d'éléments semblables placés bout à bout (*Streptocoques, Streptobacilles*); parfois, les éléments de cette série sont séparés par une cloison si fine qu'elle est peu perceptible, et le groupement nouvellement né paraît constitué par un long filament, en réalité composé, comme dans la bactéridie charbonneuse, d'une série de bactéridies identiques.

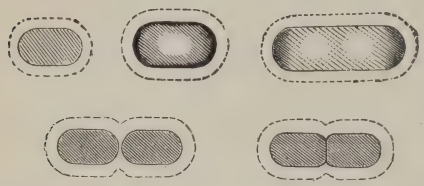

Fig. 6. — Schéma de la division des bâtonnets (Macé).

Chez certains cocci, la division peut s'opérer ainsi suivant deux diamètres perpendiculaires l'un à l'autre et dans un même plan. Il se forme alors des *tétrades* (fig. 7). Quand elle s'effectue par trois plans perpendiculaires, dans trois directions différentes, on assiste alors à la formation de masses cubiques de cocci, qu'on nomme *sarcines* (fig. 8).

Chez *Bacillus Bütschlii*, Schaudinn a montré que la division débute par l'apparition, sur la partie médiane du bâtonnet, d'une granulation réfringente qui s'élargit

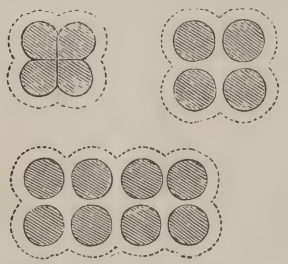

Fig. 7. — Schéma de la production des tétrades Macé).

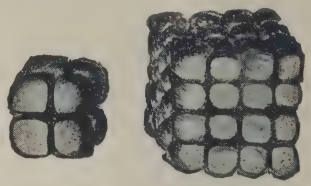

Fig. 8. — Schéma de la production des sarcines (Macé).

pour envahir la longueur de l'élément et se souder à la membrane d'enveloppe : puis, à son niveau, la substance cellulaire se raréfie et se fond ; la division est opérée.

La segmentation des bactéries est d'autant plus rapide que la nutrition est meilleure ; quand les matériaux nutritifs du milieu sont épuisés, la reproduction s'arrête.

Sporulation. — On a cru, pendant longtemps, que la formation des spores était réservée aux bactéries se trouvant dans des conditions nutritives difficiles ou dans un milieu déjà imprégné de leurs produits de désassimilation. Il n'en est pas toujours ainsi, car certains germes, en pleine période d'activité végétatrice, se repro-

duisent non seulement par segmentation pure et simple, mais aussi par sporulation.

La spore constitue en réalité la forme de résistance de la bactérie, celle qui assure la conservation de l'espèce. Elle est en effet beaucoup plus résistante que le germe où elle se produit, à l'action des agents extérieurs, lumière, oxygène, températures élevées. Avec les procédés ordinaires de coloration, la spore est impénétrable aux substances colorantes classiques; on ne peut la colorer que par des procédés spéciaux.

La sporulation s'effectue par *endospores* ou par *arthrospores*.

Endospores. — Les endospores ont été décrites en 1864 par Pasteur dans ses études sur le bacille de la *flacherie* des vers à soie; il a constaté, dans ce bacille, l'existence de points brillants qui devenaient libres après la résorption du corps microbien. Depuis lors, elles ont été observées chez un grand nombre de bactéries.

Fig. 9. — Formation d'endospore dans un bacille (Metchnikoff)

Les spores occupent soit le centre du microbe (bacille charbonneux), soit l'une de ses extrémités. Elles peuvent ne pas modifier sa forme; en d'autres cas, leur volume excédant celui de la bactérie, elles déforment cette dernière, telle la spore du bacille tétanique, dit, pour cette raison, bacille en épingle.

La formation de la spore s'effectue de la façon suivante :

En un point du corps microbien, le protoplasma se trouble et devient granuleux, sans doute par accumulation de réserve nutritive (amidon en général); puis autour de cette masse granuleuse, habituellement incolore, où, d'après certains auteurs, on perçoit une ou plusieurs gouttelettes de graisse, une membrane d'enveloppe épaisse se forme, limitant la spore qui s'est bien constituée.

Schaudinn a décrit le processus spécial qui préside, chez le *Bacillus Bütschlii*, à la formation de la spore. Ce bacille, avant la sporulation, commence par subir un début de division transversale : une cloison médiane se forme qui ne tarde pas à disparaître ; puis, aux extrémités du microbe, on constate des amas chromatiques alors que, dans le corps même, ces granulations se disposent en chapelet sinueux. Les amas des extrémités se condensent, grandissent, prenant une forme ovoïde, et s'entourent d'une membrane résistante, achevant la formation de la spore (fig. 10).

Quand la spore est constituée, le corps microbien se désagrège progressivement ; la spore est mise en liberté et tombe.

C'est ainsi que, dans les vieilles cultures de bacille tétanique

et de bacille du charbon, les spores libres sont seules perceptibles.

La germination et l'éclosion des spores s'effectuent de la façon suivante : la spore commence à pâlir, la membrane se rompt et laisse

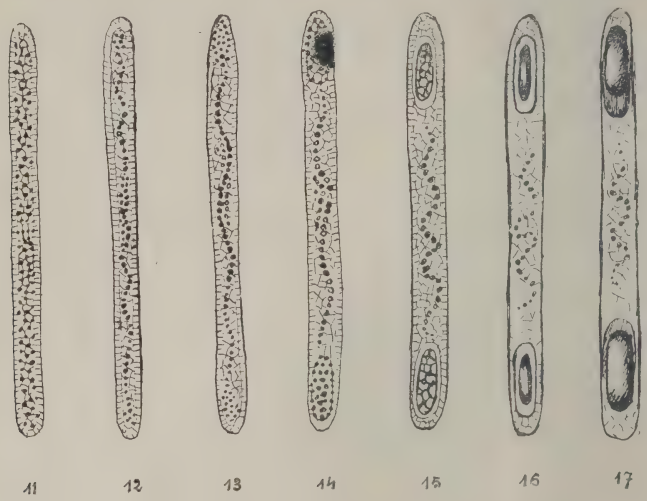

Fig. 10. — Détails de la formation d'une endospore (d'après Schaudinn).

passage à un prolongement qui présente bientôt l'aspect et les caractères de la bactérie initiale, qui a donné naissance à la spore. On observe en général l'issue de ce prolongement à l'une des extrémités du diamètre équatorial de la spore, mais aussi parfois à l'extrémité polaire, comme dans la bactéridie charbonneuse (fig. 11 et 12).

Fig. 11. — Germination d'une bactérie (Metchnikoff).

Fig. 12. — Éclosion transversale (Metchnikoff).

L'aptitude de certaines bactéries à se reproduire par sporulation peut se perdre. Il en est ainsi, comme l'ont montré Chamberland et Roux, pour la bactéridie charbonneuse. Ils ont pu priver cette dernière de la faculté de produire des spores, en soumettant les cultures à l'action du bichromate de potasse en solution faible ou d'une solution d'acide phénique ajoutée dans la proportion de 10 à 20 p. 1 000. Les caractères de végétabilité et de virulence de cette bactéridie devenue asporogène ne se modifient

pas; cette propriété nouvelle se conserve dans les générations ultérieures.

Arthrospores. — L'arthrosporulation se caractérise par la transformation totale en spore d'une bactérie entière, en général un coccus. Cette transformation s'opère sans grande différenciation ni modification très notable de la cellule qui doit sporuler. Celle-ci se gonfle pour atteindre deux à trois fois son volume antérieur; son contenu devient réfringent et s'entoure d'une membrane épaisse (fig. 13).

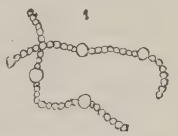

Fig. 13. — Arthrospores (Macé).

Ces arthrospores présentent les mêmes caractères de résistance que les endospores aux influences extérieures (lumière, oxygène, chaleur, antiseptiques). Elles possèdent donc toutes les propriétés générales des spores.

RESPIRATION. — AÉROBIES ET ANAÉROBIES.

Les bactéries ne peuvent vivre si elles n'ont à leur disposition de l'oxygène, qu'il soit contenu dans l'air, ou à l'état de solution dans le milieu nutritif, ou à l'état combiné avec une substance quelconque. Les unes ont besoin d'oxygène libre, sans lequel elles succombent; pour d'autres, l'oxygène libre entrave leur développement et est même nuisible à leur existence. D'où ces deux grandes classes de microbes : les microbes *aérobies* et les microbes *anaérobies*.

Aérobies. — On peut se rendre aisément compte du besoin d'oxygène qu'éprouvent les microbes aérobies : il suffit de les ensemencer dans du bouillon par exemple; après vingt-quatre ou quarante-huit heures de séjour à l'étuve à 37°, la culture, devenue trouble, est surmontée d'un voile ou d'une collerette où les microbes abondent, venant ainsi à la surface prendre la plus grande quantité possible de l'oxygène de l'air qui leur est indispensable.

L'observation peut être faite sur une goutte de culture de *B. subtilis*, disposée entre lame et lamelle. Les bacilles s'accumulent rapidement sur les bords de la lamelle, où ils peuvent puiser de l'oxygène; si on lute à la paraffine, on les voit se diriger vers les bulles d'air que peut contenir la préparation.

L'expérience d'Engelmann est encore très démonstrative : On introduit un filament d'algue verte à chlorophylle dans un milieu contenant des aérobies mobiles; on fait tomber sur ce milieu un spectre microscopique. On voit bientôt les bactéries s'accumuler au niveau des points (raies B et C de Frauenhofer) où se trouvent les

bandes d'absorption de la chlorophylle, c'est-à-dire où l'acide carbonique est décomposé et l'oxygène dégagé.

Anaérobies. — Les anaérobies sont des germes qui ne peuvent vivre en présence d'oxygène libre. Telle est la définition de Pasteur à la suite de ses observations sur le Vibrion butyrique, agent de la fermentation butyrique.

Si, dans le milieu où se développe le Vibrion butyrique, on fait passer un courant d'acide carbonique, ce germe n'en subit aucun dommage ; si, par contre, on y fait passer un courant d'air atmosphérique pendant une ou deux heures, les ferments succombent, et la fermentation butyrique s'arrête.

D'ailleurs, contrairement à ce que l'expérience a montré pour les aérobies, les anaérobies fuient le voisinage de l'air et des bulles d'air contenues dans les préparations ; ils perdent leur mobilité, tombent en vie latente ou succombent.

Il est néanmoins possible de cultiver ces anaérobies dans un milieu ordinaire où des aérobies, comme le *B. subtilis*, forment un voile à la surface. Ce dernier germe absorbe pour lui seul tout l'oxygène du milieu, qui ne gêne plus le développement de l'anaérobie. C'est ce qu'a réalisé Vaillard pour la culture du bacille tétanique.

Contrairement aux cellules végétatives des anaérobies, les spores de ces derniers supportent impunément le contact prolongé de l'oxygène libre. Mais, transportées dans un milieu où elles peuvent germer, la germination ne s'opère que dans un milieu privé d'oxygène.

Les anaérobies, qui ne peuvent vivre en présence d'oxygène libre, utilisent cependant l'oxygène existant à l'état de combinaison dans les matières alimentaires du milieu où ils sont placés.

Anaérobies facultatifs. — Entre les anaérobies stricts, ne tolérant pour pouvoir vivre et pulluler aucune trace d'oxygène, et les aérobies qui exigent, au contraire, la présence d'oxygène, il y a place pour toute une catégorie de germes qui se développent fort bien dans les milieux aérés, mais peuvent, bien que pullulant plus faiblement, se passer d'oxygène. Ce sont les *anaérobies facultatifs*. Le *bacille typhique*, le *colibacille* sont du nombre.

En réalité, ces anaérobies facultatifs constituent les intermédiaires entre les aérobies et les anaérobies stricts, chaque espèce ayant besoin d'oxygène qu'elle prend sous une forme ou une autre. D'ailleurs, on peut acclimater lentement et progressivement tous ces germes à une vie différente, à cet égard, de celle qui leur est coutumière et normale. En effet, Rosenthal a pu habituer petit à petit les anaérobies stricts à vivre au contact de l'oxygène;

il a obtenu cette « aérobisation » en diminuant progressivement le vide, ou en cultivant ces germes dans des culots de gélose de moins en moins élevés, diminuant ainsi leur profondeur. Par contre, il a habitué des aérobies stricts, comme la Bactéridie charbonneuse à l'anaérobiose facultative. Nægeli, puis Nencki avaient fait des observations analogues avec diverses bactéries de fermentation.

Les microbes anaérobies sont abondants dans la nature ; ce sont les agents principaux des fermentations : on les rencontre de préférence dans la profondeur du sol, dans la vase, les égouts, les fumiers, les matières excrémentitielles animales, là, en un mot, où l'air est rare et est remplacé par d'autres gaz : c'est d'ailleurs dans ces milieux que les fermentations les plus actives s'accomplissent pour opérer la transformation de la matière organique.

Enfin certains d'entre eux sont les agents pathogènes spécifiques d'une foule d'infections bien définies : Vibrion septique, bacille tétanique, bacille du charbon symptomatique, bacille du botulisme. D'autres déterminent fréquemment des suppurations fétides et gangreneuses ; ils se trouvent seuls ou associés à d'autres germes (Veillon).

NUTRITION.

Pour pouvoir vivre, toute cellule vivante a besoin d'aliments, qui doivent contenir les substances entrant dans la constitution du corps cellulaire. Il en est de même de la cellule bactérienne.

Milieux naturels. — Les recherches chimiques montrent que la cellule bactérienne contient de l'eau, de la cellulose, des matières amylacées, sucrées, des matières albuminoïdes, des matières grasses, enfin des principes minéraux. Les corps qui dominent sont donc : le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote et des substances minérales (soufre, phosphore, etc.), qui interviennent à titre accessoire.

Dans les milieux extérieurs, les bactéries trouvent tous ces corps simples : le *carbone* provient des substances ternaires : sucre, amidon, glycérine, etc., qui subissent, en vue de l'assimilation, des modifications dues à l'action de certaines diastases.

Elles trouvent l'*azote* dans les matières albuminoïdes, que beaucoup transforment en peptones, substances solubles et assimilables, dues, ici encore, à l'action de ferments spéciaux ; l'azote provient encore des sels ammoniacaux, des nitrates de soude et de potasse, de l'urée, de l'albumine, de la tyrosine, voire même de l'asparagine. L'azote gazeux de l'atmosphère peut être assimilé en nature par

certaines bactéries : telles le *Clostridium pasteurianum* (Winogradsky), les *microbes des nodosités des légumineuses* (Mazé), etc.

Les *aliments minéraux* sont le phosphore, le soufre, le calcium, le potassium, le magnésium, le fer, le chlore, le silicium.

Milieux artificiels, milieux de culture. — Quand on veut, au laboratoire, cultiver les bactéries *in vitro*, il faut leur fournir les éléments essentiels à leur existence et faire varier la composition du milieu suivant les exigences particulières de chaque microbe.

On peut distinguer à cet égard : les *milieux usuels*, qui permettent la culture de la plupart des germes : qu'il s'agisse de milieux liquides (bouillon par exemple) ou de milieux solides (gélose, gélatine), on fait entrer dans leur composition la plupart des substances nutritives qui sont nécessaires à leur nutrition : macération de viande, peptone, sel marin, phosphates de soude, de magnésie, etc. ; les *milieux spéciaux* dont on fait varier la constitution suivant la qualité du germe. Citons à ce propos les milieux à base d'albumine animale ou humaine (sérum coagulé, gélose-sang, gélose-ascite, sérum liquide), les milieux sucrés (maltose, glucose, etc.), les milieux végétaux (tranches de pomme de terre, de carotte, d'artichaut).

On prépare, en outre, des infusions végétales (infusions de foin, de paille, eau de touraillons, etc.), des milieux chimiquement définis (liquide de Cohn, de Nægeli, dont on connaît diverses formules à employer suivant les cas, etc.).

Parmi les milieux chimiquement définis, le *liquide de Raulin* est constitué par des substances purement minérales :

Eau	1 500 grammes.
Sucre candi	70 —
Acide tartrique	4 —
Nitrate d'ammoniaque	4 —
Phosphate d'ammoniaque	0gr,60
Carbonate de potasse	0gr,60
— de magnésie	0gr,40
Sulfate d'ammoniaque	0gr,25
— de zinc	0gr,07
— de fer	0gr,07
Silicate de potasse	0gr,07

Ce milieu, composé par tâtonnements pour la culture de l'*Aspergillus niger*, est important à connaître pour montrer l'influence que chacune des substances constituantes exerce sur le développement de cette moisissure. Qu'on supprime ou qu'on diminue seulement l'un des sels minéraux qui entrent dans sa composition, la récolte

de l'*Aspergillus*, constatée par la pesée, diminue dans des proportions très importantes.

Il en résulte donc que, pour un microbe donné, le choix de la substance alimentaire possède une influence considérable sur le développement de ce germe.

Il existe à ce sujet des variations considérables : certaines bactéries peuvent se contenter, pour vivre et pulluler, d'une quantité d'aliments fort minime : il en est qui se développent dans l'eau stérilisée, voire même l'eau distillée ; d'autres, par contre, exigent la présence de certains éléments indispensables à leur vie artificielle, tels le Méningocoque, le Gonocoque, qui, surtout lors des premières générations, ne poussent qu'à la condition de trouver des albumines, et plus particulièrement une albumine humaine.

Enfin les bactéries réclament, pour la plupart, une *réaction neutre*, voire même légèrement *alcaline* du milieu. L'acidité, à part quelques exceptions, leur est défavorable ; il en est de même d'une trop forte alcalinité. Quand, au cours du développement microbien, l'acidité ou une trop forte alcalinité apparaît, le développement cesse.

ASSIMILATION.

Les matières nutritives destinées à l'alimentation des bactéries peuvent pénétrer directement dans le corps microbien après avoir franchi la membrane qui leur sert d'enveloppe ; mais d'autres demandent à être préalablement transformées.

Ces phénomènes d'assimilation sont, en réalité, assez mal connus. On ignore ainsi comment ils peuvent amener la synthèse des substances ternaires et des albuminoïdes. Dans le premier cas, il es peu d'exemples montrant la fixation du carbone. Il en est de même des albuminoïdes, pour lesquelles le mode de synthèse varie assurément avec la forme suivant laquelle l'azote se présente.

On possède cependant quelques renseignements sur la fixation de l'azote par les bactéries :

De nombreux observateurs ont été frappés par la richesse du sol en azote. Les terres même non fumées, comme les terres de montagnes et de forêts, en contiennent en grandes proportions ; et cependant la déperdition de ce gaz est considérable, et ces terres continuent à être très fertiles ; elles conservent, en effet, leur azote et en gagnent. Le premier, Berthelot a démontré que cette fixation de l'azote par le sol était opérée par des êtres animés : des microbes ; si, en effet, une terre arable fixant de l'azote atmosphérique est stérilisée par un chauffage à 120°, ce pouvoir fixateur ne s'exerce plus.

De recherches ultérieures il résulte que cette fixation d'azote s'effectue par des bactéries situées jusqu'à 30 centimètres dans la profondeur du sol, leur abondance étant d'autant plus marquée que le sol est plus aéré ; de ces bactéries, les unes sont anaérobies, les autres aérobies ; elles réclament comme aliments les hydrocarbonés, d'où elles reçoivent l'énergie, puis des aliments minéraux.

Certaines Mucédinées sont capables ainsi de fixer de l'azote. Enfin ce pouvoir est dévolu encore à des germes qui ne vivent pas libres dans le sol, mais dans les *nodosités des légumineuses*. Ces nodosités, en effet, déjà vues en 1687 par Malpighi, sont le produit d'une infection des racines par des bactéries aérobies de forme irrégulière, qu'on a nommées *bactéroïdes*, et qui sont contenues dans l'intérieur des tumeurs auxquelles elles ont donné naissance.

Ces bactéries ont été distinguées par Mazé en *calcicoles*, adaptées aux terrains calcaires, et *calcifuges*, adaptées aux terrains acides. Elles se nourrissent d'éléments hydrocarbonés que leur fournit la plante, à laquelle elles fournissent l'azote, indispensable à l'existence des végétaux. Celles qui sont libres sont d'ailleurs attirées vers les racines des légumineuses, comme en vertu d'une chimiotaxie positive, par les hydrates de carbone du type végétal.

Ces bactéroïdes pénètrent dans les radicules et s'entourent d'une gaine muqueuse qui est résorbée par la sève, le mucus représentant l'aliment azoté qu'elles élaborent.

La démonstration de la fixation de l'azote par ces germes a été faite par Mazé dans les expériences de culture en gélose, additionnée de bouillon de haricots, sur laquelle il fit passer un courant d'air. On observe alors une déperdition d'azote dans l'air et la formation d'un dépôt muqueux analogue à celui qui existe dans les nodosités.

DÉSASSIMILATION.

Comme toutes les cellules vivantes, les bactéries produisent des substances de déchet, qui s'accumulent dans les milieux de culture et peuvent ensuite en entraver le développement. Ces substances tirent leur origine soit du protoplasma lui-même, soit des produits de transformation provenant de la nutrition. Elles sont fixes ou volatiles.

Produits fixes : ce sont des acides organiques (lactique, formique, acétique), de l'aldéhyde, de la leucine, de la tyrosine, du glycocolle.

Produits volatils : ce sont l'hydrogène, l'acide carbonique, l'hydrogène sulfuré ou phosphoré, des carbures d'hydrogène ; parmi eux, se rangent encore des acides gras, des ammoniaques composées, des mercaptans, de l'indol, du scatol, voire même du phénol.

ACTION DES AGENTS EXTÉRIEURS SUR LES BACTÉRIES.

Les agents extérieurs font subir aux bactéries des modifications vitales, biologiques, etc., qui sont, suivant les cas, plus ou moins accentuées. Il y a lieu d'envisager à cet égard les agents physiques, chimiques, et même les microbes.

Agents physiques. — ***Température.*** — La température est assurément un des éléments qui influent le plus sur les propriétés biologiques des bactéries.

Chaleur. — Comme toute cellule vivante, les microbes ont besoin de chaleur pour se développer. Mais chacun d'eux possède, à cet égard, des propriétés qui lui sont particulières.

En général, les bactéries saprophytes, qu'on rencontre dans l'air et l'eau, peuvent commencer à se développer à 10° et même 5°. Les pathogènes, adaptées le plus souvent à la température des organismes où elles pullulent, exigent une température plus élevée; il en est qui, comme le Pneumocoque, exigent une température supérieure à 24°; le bacille de la tuberculose ne commence à se développer que vers 28°. A partir de leur température *minima*, propre à chacun d'eux, les microbes se développent d'autant plus facilement que la température s'élève, mais jusqu'à une limite *maxima*, au delà de laquelle la végétation cesse et que l'on fixe en général vers 42°. Mais entre ces deux extrêmes, chacun possède une température qui favorise mieux que toute autre la pullulation : c'est la température *optima*, oscillant en général entre 37° et 38°. Elle peut varier suivant l'espèce microbienne envisagée. C'est ainsi que la température optima du Pneumocoque égale 35°, celle du bacille de Koch 38°; celle du bacille phosphorescent 5° à 10°; celle du bacille thermophile de Miquel 65° à 70°.

De même la résistance vitale des bactéries à la température varie suivant les espèces, suivant la forme, sporulée ou non, suivant que la chaleur est sèche ou humide.

Certaines bactéries sont facilement tuées par un chauffage au bain-marie à 58° ou 60° pendant trente minutes; c'est le fait de beaucoup de microbes pathogènes dans leur forme végétative; d'autres, comme les bactéries dites *thermophiles*, supportent des températures très élevées et les exigent même parfois pour se développer.

Ces bactéries thermophiles se trouvent un peu partout dans l'eau, le sol, l'intestin humain. Le bacille thermophile de Miquel vit de préférence à 60°-70°. Sur les fumerolles de Naples, certaines bactéries vivent à 60°. Certes et Garrigou ont isolé dans une eau chaude de

Luchon (64°) un microbe qui se développe à cette température. Les bactéries sporulées sont plus résistantes que les bactéries dénuées de spores : le *Bacillus subtilis* résiste à la température de 100° prolongée pendant une heure : il faut quinze minutes à 105°, ou cinq minutes à 110° pour le tuer.

Les spores charbonneuses résistent fort longtemps à 80° de chaleur humide; à 100° elles meurent en six minutes.

La chaleur sèche est moins efficace : d'après Koch, les spores du charbon et du *Bacillus subtilis* peuvent encore germer à 120° de chaleur sèche.

L'action de la chaleur sur les bactéries a été utilisée par Pasteur dans ses expériences sur les vaccinations pour atténuer la virulence de la bactéridie charbonneuse. En effet, entre le degré de chaleur le plus favorable à la vie d'un microbe et le point où il succombe, il existe un intervalle où, avec les manifestations vitales, la virulence s'atténue au fur et à mesure que la température s'approche du degré mortel. Ainsi, d'après les expériences de Toussaint, puis de Chauveau, la bactéridie charbonneuse (forme végétative) perd sa virulence quand elle est chauffée à 55°; cette virulence s'atténue par chauffage à 52° pendant six minutes, et cette atténuation s'accroît quand le temps de chauffage à 52° est prolongé pendant dix, douze et quatorze minutes.

Enfin cette action de la température a été utilisée pour obtenir l'isolement de certains germes sporulés. Pasteur isolait ainsi le Vibrion septique du sol : il émulsionnait dans l'eau une parcelle de terre et la laissait reposer. Il chauffait ce dépôt à 90° pendant quelques minutes, et l'injectait sous la peau d'un animal. Ce dernier succombait le plus souvent de septicémie, et à l'autopsie le Vibrion septique pouvait être recueilli à l'état de pureté. C'est un procédé analogue que Vaillard utilisait pour obtenir des cultures pures de tétanos.

Froid. — La résistance des bactéries au froid est assez variable, mais en général elles peuvent supporter des températures très basses. Beaucoup de bactéries se conservent à la glacière pendant longtemps et gardent toute leur virulence. Von Freich, Gibier, etc. ont fait des expériences sériées où ils ont montré que certains microbes supportaient impunément un froid de 30°, 50°, 70°, etc. D'Arsonval et Charrin ont ainsi soumis le bacille pyocyanique à — 40° ou — 60° et plus bas encore; ce germe résistait, mais sa morphologie était modifiée. Pictet et Yung ont vu que les spores charbonneuses exposées à — 130° pendant vingt heures étaient encore vivantes et virulentes; la bactéridie seule succombait.

A côté de ces bactéries si résistantes au froid, d'autres, comme le méningocoque, sont facilement tuées par un court séjour à 0°.

Lumière. — Le lumière agit incontestablement sur la vitalité des bactéries.

Un grand nombre d'entre elles succombent quand elles sont soumises à son influence. C'est ce qui résulte des recherches de Duclaux, Roux, Pansini, Dieudonné, etc. Il est facile de s'en rendre compte en exposant des cultures vivantes de germes variés à l'action de la lumière solaire, de la lumière diffuse, et en comparant leur vitalité, toutes choses égales d'ailleurs, avec celle d'une culture conservée à l'obscurité ou dans des tubes de verre noir pour les protéger contre la lumière.

En général la lumière solaire possède une action stérilisante énergique sur les cultures déjà développées ; elle possède aussi une action retardante sur leur développement. Le maximum de pouvoir bactéricide a lieu quand les rayons tombent perpendiculairement sur les cultures.

La lumière diffuse présente le même pouvoir, mais moins marqué.

Cette action bactéricide s'effectue après une durée qui varie avec chaque bactérie. D'après Roux, la bactérie charbonneuse succombe après trente heures d'insolation. Buchner a montré qu'une heure suffit pour tuer le Colibacille en suspension dans l'eau. Janowski, puis Vincent ont vu le bacille typhique succomber en quatre ou dix heures. Le bacille tuberculeux isolé meurt en cinq à sept heures (Koch et Migueco), etc. Il est vrai que ces résultats sont variables suivant le milieu où les bactéries se trouvent, suivant leur abondance, suivant les conditions auxquelles elles sont exposées.

D'après Duclaux, l'action de la lumière est liée à l'action de l'oxygène et de l'oxydation qu'elle rend très active.

Des travaux de Kotliar, de Dieudonné, il résulte que l'action respective des divers rayons du spectre est différente suivant la catégorie envisagée. Les rayons jaunes et rouges sont les moins bactéricides; les plus actifs sont les rayons bleus violets, et surtout *ultra-violets*. C'est d'ailleurs la propriété de ces derniers que Courmont et Nogier ont utilisée pour la stérilisation des eaux potables. Les rayons ultra-violets atténuent le bacille tuberculeux après une minute d'exposition ; après dix minutes, le bacille succombe.

Les rayons Rœntgen ont été expérimentés, mais sans résultat bien décisif.

Enfin Pfeiffer et Friedberger ont prouvé l'action bactéricide du *radium*. Elle existe, mais serait assez superficielle. C'est aussi la conclusion de Bouchard et Balthazard, d'après qui le radium se con-

tenterait de modifier la production du pigment de certains germes.

Dessiccation. — La dessiccation possède en général une influence nocive sur la vitalité des microbes, en leur enlevant l'eau qui entre dans leur constitution. D'autres lui résistent cependant assez longtemps. Aussi aucune proposition générale ne peut être, à cet égard, érigée en loi. Tout dépend de la qualité de la bactérie, de la rapidité de la dessiccation, de la température à laquelle elle s'exerce. Il existe aussi des différences suivant que le microbe est sporulé ou asporulé; les spores opposent à la dessiccation une assez grande résistance.

Enfin, tout peut dépendre encore de la nature du milieu où le germe est englobé; un milieu albumineux comme le sang, les crachats, etc., le protège assurément mieux contre cette influence que si le germe était nu.

Agents chimiques. — Antiseptiques. — La vitalité des bactéries est défavorablement influencée par une foule de substances chimiques dites antiseptiques.

Les antiseptiques agissent par simple destruction de la cellule bactérienne, ou en coagulant son protoplasma; la mort du microbe est alors fatale.

Les variations d'action antiseptique des diverses substances usitées sont en rapport avec les conditions dépendant des produits eux-mêmes et de la bactérie. Elles s'observent suivant la nature du produit, son état liquide ou gazeux, son degré de concentration, son temps d'action, la température ambiante. Elles dépendent, d'autre part, des différences individuelles de résistance du germe en cause, du milieu où il vit, de l'abondance de ses éléments, de son état de sécheresse ou d'humidité ; enfin les spores sont infiniment plus résistantes que les bactéries non sporulées.

L'action d'un antiseptique peut être étudiée et évaluée en le faisant agir sur une masse déterminée de culture vivante, ou encore sur des fils de soie imprégnés de cette culture. On note, comparativement à des témoins, le temps qu'une solution antiseptique exige pour tuer le microbe à l'étude.

Agents microbiens. — Les bactéries subissent facilement l'influence d'autres bactéries avec lesquelles elles se trouvent en contact.

Cette influence peut être nocive. On observe le fait quand, de deux bactéries vivant dans le même milieu, l'une utilise plus que l'autre les éléments nutritifs mis à leur disposition. La première végète et se multiplie abondamment, enlevant à la seconde les conditions essentielles de sa nutrition et de sa vie. Elle se développe alors aux dépens de l'autre qui succombe C'est ce qui se produit encore quand une bactérie fait subir au milieu des conditions

défavorables au développement de l'autre. Il se produit ainsi une véritable *concurrence vitale* dont on retrouve maints exemples dans la nature, notamment dans l'eau et le sol, où certaines catégories de germes prennent le pas sur d'autres espèces.

A côté de cette concurrence vitale, il y a lieu de signaler l'*antagonisme* naturel d'une bactérie vis-à-vis d'une autre; on a signalé ainsi l'antagonisme de la bactéridie charbonneuse et du bacille pyocyanique; il s'observe non seulement en culture *in vitro*, mais aussi dans l'organisme infecté par ces deux germes.

D'autre part, certains microbes semblent jouer un *rôle favorisant* pour des germes avec lesquels ils se trouvent. Tel le pouvoir favorisant des sarcines, des torulas pour le vibrion cholérique (Metchnikoff). Nous verrons aussi le rôle favorisant de certaines *associations microbiennes* dans l'étiologie de certaines infections; les microbes associés agissent alors indirectement par leur pouvoir chimiotactique positif sur les leucocytes qui les englobent, laissant aux autres bactéries la faculté de pulluler et d'exercer leur pouvoir infectieux.

Enfin, on connaît des exemples nombreux de *symbiose*, c'est-à-dire de vie en commun, qui ne nuit en rien, bien au contraire parfois, au développement simultané de deux bactéries, *in vivo* comme *in vitro*.

PRODUCTION DE CHALEUR.

De la combustion des aliments résulte en général une libération d'énergie dont la plus grande partie sert à l'entretien de la cellule bactérienne; la chaleur qui se trouve en excès élève la température du milieu. Le fait est particulièrement perceptible chez les levures, qu'on les fasse vivre dans les gaz inertes, ou, ce qui est préférable, en présence de l'oxygène, ou mieux encore, à l'abri de l'air, mais lors de la fermentation. Eriksson a pu ainsi constater dans ce dernier cas une élévation de 3°,9. On sait d'ailleurs que, dans les fumiers, les tas de foin, surtout humide, les balles de coton, la chaleur peut égaler parfois 60°, 70° et même davantage.

PRODUCTION DE LUMIÈRE. — PHOSPHORESCENCE.

On remarque bien souvent que le bois en putréfaction, des poissons morts, de la viande exposée à l'air pendant plusieurs jours, des champignons, certaines eaux de mer émettent de la lumière et sont phosphorescents.

La phosphorescence est liée à la présence, à la surface de ces produits, de microbes spéciaux dont Pflüger a démontré l'existence,

et dont on connaît actuellement une trentaine d'échantillons, appartenant à plusieurs espèces, représentées le plus souvent par le type bacille, plus rarement par des Micrococques ou des Vibrions.

Cette fonction photogène particulière est soumise à certaines conditions.

Elle dépend tout d'abord de la *température*. Il faut en moyenne une température de 20 à 30°, mais ce chiffre peut varier dans des proportions importantes suivant l'espèce microbienne; en général, les températures basses sont plus favorables que les températures élevées.

L'*alimentation* des bactéries photogènes influe beaucoup aussi sur cette fonction spéciale : la plupart exigent la présence du sel, d'autres de l'azote et du carbone ; mais elles ont toutes besoin d'oxygène ; la phosphorescence ne se produit pas dans le vide, et, dans un milieu contenant de l'oxygène, la phosphorescence cesse quand ce gaz est consommé.

Pour montrer cette phosphorescence, il suffit d'ensemencer un bacille photogène en gélatine au bouillon de poisson, à laquelle on ajoute 10 p. 100 de sel marin; on peut aussi prendre un hareng frais, arrosé d'eau salée à 5 p. 100, ajouter du sucre, de la peptone, de la glycérine, et le laisser ainsi à 10° environ. Après quarante-huit heures, le jus et la chair émettent de la lumière.

La lumière phosphorescente produite par les bactéries photogènes est d'intensité variable; en certains cas, elle peut être assez accusée pour qu'on puisse, à sa lueur, lire l'heure à une montre. R. Dubois a même photographié à leur propre lumière les colonies de ces germes. Cette lumière attire les tiges de jeunes plantes en germination, mais ne peut faire apparaître la chlorophylle.

R. Dubois a attribué cette propriété lumineuse à la présence d'une substance spéciale, la *luciférine*, qui brille en présence de l'air. Pour d'autres, elle est liée à la vie cellulaire, car si on détruit la bactérie photogène, on empêche la phosphorescence.

PRODUCTION DE PIGMENTS.

Un certain nombre de germes sécrètent des pigments, produits par le protoplasma cellulaire. Ils peuvent diffuser dans les milieux où on les cultive, ou être retenus dans le corps microbien, d'où ils ne s'échappent qu'après la mort de la cellule bactérienne.

Caractères généraux. — Les microbes producteurs de pigments sont très répandus dans la nature. On connaît des *levures* noires, roses, brunes ; le *Streptothrix maduræ* produit une teinte rouge vif

avec reflets métalliques ; l'*Actynomyces bovis* en culture présente une teinte jaune qui vire ensuite au vert, puis au noir.

Les colonies de *Sarcina lutea*, *Micrococcus cereus flavus*, *Diplococcus pharyngis flavus* sont teintées en jaune ou jaune-citron ; *Staphylococcus aureus* prend une couleur jaune d'or; les cultures de *Micrococcus prodigiosus* sont rouges. Les *bacilles violets* donnent une teinte violet noir. Le bacille du lait bleu (*Bacillus syncyanus*) colore le lait en bleu de ciel ou bleu grisâtre. Le *Pyocyanique* ou bacille du pus bleu développe une teinte bleu verdâtre ; il peut produire en outre un pigment fluorescent et un pigment vert non fluorescent. On en connaît une variété à pigment noir.

D'autres bactéries produisent une fluorescence verte (*Bacillus fluorescens liquefaciens*, *Bacillus fluorescens putridus*).

On connaît assez mal la nature de ces pigments; Migula a observé pour certains la solubilité dans l'eau, mais la plupart y sont insolubles et sont solubles au contraire dans l'alcool, l'acétone, le chloroforme.

Certains peuvent être rangés dans la catégorie des pigments végétaux, nommés *lipochromes*, substances grasses, insolubles dans l'eau, mais solubles dans l'alcool. Il en est ainsi du pigment des staphylocoques, sarcines, etc. D'autres, comme la pyocyanine, la chlororaphine, se rapprochent assez étroitement des alcaloïdes, dont ils possèdent la plupart des réactions.

Leur élaboration semble être liée à la production de diastases et en particulier d'oxydases.

Ces pigments s'oxydent très facilement ; ils semblent fixer avidement l'oxygène.

Conditions de la production du pigment. — Divers facteurs influent sur la production des pigments microbiens :

La *lumière* n'est pas indispensable, car le *M. prodigiosus*, le *B. violaceus* produisent leur pigment dans l'obscurité.

Par contre, l'*oxygène* est nécessaire; une bactérie très chromogène cesse de l'être quand elle est cultivée à l'abri de l'air.

La *constitution chimique du milieu* peut, en certains cas, présenter une grande importance. Pour le Pyocyanique, Gessard a montré que la fluorescence ne se produit pas en l'absence de phosphates, et que le pigment noir réclame la présence de tyrosine.

De même la *réaction du milieu* présente une certaine influence. En général, les pigments préfèrent un milieu neutre ; ainsi, dans un milieu alcalin, au bout de plusieurs générations, le *M. prodigiosus* devient incolore. Par contre, le Pyocyanique, les fluorescents préfèrent une réaction basique. Les réactions influent encore sur la

teinte des pigments : ainsi le bacille du lait bleu, cultivé en milieu neutre, donne une teinte gris ardoisé; en milieu acide, il devient bleu ; en milieu alcalin, il devient rougeâtre. Un même pigment peut dès lors présenter des colorations successivement différentes suivant les réactions des milieux de culture.

La puissance chromogène paraît être encore en rapport avec la *vitalité du germe* ; elle diminue quand la vitalité s'atténue, soit spontanément, soit sous l'influence d'antiseptiques. C'est ainsi que Charrin et Roger ont pu graduer la production pigmentaire du Pyocyanique en additionnant les cultures de solutions de sublimé.

L'influence de la *température* est indéniable. En moyenne, on peut considérer comme optima les températures comprises entre 20° et 25°. Ainsi *M. prodigiosus*, *Bacillus fluorescens putridus* donnent un pigment abondant à 20° ou 22° ; cultivés à 25°, leur culture est incolore. Mais en habituant progressivement ces germes à des températures de 35° à 37°, on peut arriver à leur faire sécréter leur pigment.

SÉCRÉTION DE DIASTASE.

Les bactéries sont des agents producteurs de *diastases* ou *enzymes*, substances qui rendent assimilables les éléments non nutritifs, ou qui disloquent les composés fermentescibles pour engendrer la chaleur nécessaire à la vie de la bactérie. Ainsi l'amidon, la cellulose, l'albumine, la fibrine ne peuvent être assimilés qu'à la faveur de transformations opérées par les diastases. Le sucre de canne doit être interverti; les nitrates doivent être réduits. Ces substances diastasiques sont retenues dans le corps cellulaire ou bien diffusent dans le liquide ambiant. On ignore leur constitution; on ne connaît que leurs propriétés et leurs effets.

Les diastases sont solubles dans l'eau et la glycérine ; beaucoup d'entres elles sont retenues par les filtres : elles dialysent mal et adhèrent aux précipités que l'on produit dans les liquides qui les contiennent. Elles sont détruites par une chaleur relativement peu élevée, variable suivant la diastase envisagée (entre 55° et 80°); cependant, quand elles ont été préalablement desséchées, leur résistance à la température est beaucoup plus accusée : elles peuvent alors supporter une température de 100° et même davantage.

La lumière leur est nuisible : la sucrase de l'*Aspergillus niger*, l'invertine sont en effet détruites par une exposition de quelques heures au soleil

L'action nocive de la chaleur et de la lumière s'exerce de préférence en présence de l'air et de l'oxygène.

Les enzymes manifestent leurs propriétés soit en milieu acide, comme la sucrase, soit en milieu alcalin, comme la trypsine.

Enfin l'action de chaque diastase peut être empêchée ou favorisée par la présence de sels, dont l'action peut être diamétralement opposée suivant la nature de la diastase : ainsi l'action de la présure est favorisée par l'action des sels de chaux, qui au contraire empêchent celle de l'amylase.

Duclaux a divisé les diastases en plusieurs classes :

Diastases coagulantes et décoagulantes. — Dans ce groupe rentrent la *présure*, qui coagule le lait, et la *caséase*, qui redissout la caséine; la *trypsine*, qui contribue à assurer la liquéfaction de la gélatine et du sérum coagulé.

Diastases hydrolysantes et déshydrolysantes. — A ce groupe appartiennent l'*uréase*, qui produit la fermentation ammoniacale, l'*amylase* et la *dextrinase*, *sucrase*, *maltase*, *inulase*, etc.

L'amylase convertit l'amidon en dextrine; la dextrinase transforme la dextrine en maltase.

Diastases oxydantes et désoxydantes. — Tels les *oxydases* à qui l'on attribue les changements de coloration des milieux de cultures (pomme de terre notamment); le *philothion*, qui possède des propriétés réductrices et provoque la formation de sulfure d'hydrogène avec la fleur de soufre.

Diastases de décomposition. — La *zymase*, découverte par Buchner, est seule à représenter ce groupe.

ACTIONS FERMENTATIVES. — FERMENTATIONS.

On nommait autrefois « fermentation » les phénomènes de décomposition accompagnés de bouillonnement de la masse liquide, de boursouflement et de dégagement de gaz : telle, par exemple, la fermentation du moût de raisin. Mais on fut obligé de reconnaître que des fermentations pouvaient s'opérer sans aucun dégagement gazeux perceptible : tel le cas de la fermentation acétique.

D'après M. Nicolle, la fermentation « est un phénomène vital, dans lequel il y a une disproportion énorme entre le poids de l'organisme actif et celui du corps transformé ». En effet, les microbes sont capables de transformer sous un poids extrêmement réduit des quantités énormes de matière fermentescible. La fermentation se rapproche assez étroitement des « actions diastasiques dues à ce qu'on appelait autrefois les ferments chimiques ».

Pour que l'action fermentative puisse s'opérer, certains microbes ont besoin du secours de l'oxygène (fermentations par oxydation);

d'autres peuvent s'en passer, ou exigent même son absence (fermentation par réduction).

On connaît de nombreuses variétés de fermentations.

Fermentation alcoolique. — C'est la transformation des sucres en alcool et acide carbonique. Découverte par Lavoisier, elle a été étudiée surtout par Pasteur, qui l'a attribuée à l'action vitale des levures.

Ces levures (levures hautes fonctionnant à 16° à 20°, et les levures basses, à 6° à 8°) agissent sur les *saccharides*. Parmi les *monosaccharides*, la glucose, la mannose, la galactose sont fermentescibles directement sous leur influence. Les *disaccharides* (saccharose, lactose, maltose, etc.) doivent préalablement être transformées en monosaccharides par action diastasique. Ainsi la levure de bière (par l'invertine) dédouble la saccharose en glucose et lévulose, puis disloque ces derniers en donnant de l'alcool et de l'acide carbonique. Il en est de même des *polysaccharides* (inuline, amidon, dextrine).

Outre l'alcool et l'acide carbonique, la fermentation alcoolique s'accompagne de la formation de glycérine, d'acide succinique, d'aldéhyde, d'acides volatils et de divers éthers.

Cette action fermentative des levures est due à la *zymase*. Elle s'opère en anaérobiose, mais Pasteur a démontré qu'au bout d'un certain temps l'oxygène devient nécessaire ; il en suffit de traces pour réactiver une fermentation disparue.

Fermentation lactique. — Elle s'opère par la précipitation de la caséine, effectuée par le dédoublement de la lactose en acide lactique. Divers éléments microbiens peuvent la produire : le bacille de Pasteur et Hüppe, et divers ferments contenus dans l'air et l'eau (Miquel). En outre de ces ferments proprement dits, des bactéries diverses : bacilles typhique et paratyphique, colibacille, vibrions, etc., sont capables de l'assurer. Cette fermentation par les microbes pathogènes intéresse au plus haut point le bactériologiste au point de vue de l'identification des espèces (Voy. à cet égard l'étude de chaque bactérie en particulier).

Il existe encore des fermentations sucrées voisines de la fermentation lactique : on connaît ainsi les fermentations des sucres suivants : glucose, lévulose, mannine, dextrine, maltose, galactose, saccharose, que nous aurons souvent l'occasion d'étudier.

Ces fermentations spéciales s'opèrent de préférence à 30-35° en milieu légèrement alcalin, et en contact avec l'oxygène.

Dans les milieux de cultures où elles s'effectuent, elles s'arrêtent en général quand la quantité d'acide formée atteint 0,6 à 0,8 p. 100.

Fermentation butyrique. — La fermentation butyrique s'ob-

serve avec l'amidon, la dextrine, certaines celluloses, la saccharose, la glucose, la lactose. Mais, comme dans les fermentations alcoolique et lactique, les disaccharides et polysaccharides doivent être attaqués préalablement par l'hydrolyse.

Les agents microbiens capables de la produire sont assez nombreux. On connaît notamment le bacille butyrique de Hüppe, qui l'effectue en présence d'oxygène : le Vibrion de Pasteur, l'*Amylobacter* de Van Tieghem, etc., qui agissent sans le secours d'oxygène. La fermentation butyrique se produit parfois après la fermentation lactique.

En dehors de l'acide butyrique, on trouve, après la fermentation, de l'hydrogène, des acides : carbonique, acétique, formique, de l'alcool butylique, etc.

Fermentation acétique. — La fermentation acétique s'observe sur les boissons alcooliques en général et le vin en particulier. Qu'on les abandonne à l'air, on voit se développer à la surface un voile mince, velouté; une odeur aigrelette de vinaigre apparaît.

Pasteur a montré que l'agent fermentatif est un microbe très petit, disposé en diplobacilles, mais en réalité très polymorphe; il l'a nommé *Bacterium aceti*.

La fermentation acétique se produit au maximum entre 20 et 30°, à la faveur d'une aération énergique; sans cette aération, l'alcool se transforme en aldéhyde; c'est ce qui se produit encore quand la teneur en alcool est inférieure à 10 p. 100.

Fermentation ammoniacale. — Elle est le plus habituellement due à l'action d'un microcoque étudié par Pasteur et Van Tieghem. Miquel en a isolé d'autres qui proviennent de l'air, des eaux, etc. Leur action fermentative est due à la production d'une diastase qu'on a nommée *uréase*. Sous son influence, l'urine se trouble et devient alcaline, en même temps que les phosphates et les matières organiques se déposent; l'urée est transformée en carbonate d'ammoniaque qui ne tarde pas à se convertir en sesqui, puis en bicarbonate d'ammoniaque : l'ammoniaque se dégage. Les mêmes ferments peuvent dédoubler le glycocolle et l'asparagine.

Enfin cette fermentation ammoniacale s'opère strictement en présence de l'air et de préférence à la température de 30 à 33°.

Elle est favorisée par la lumière et empêchée par l'acidité.

Nitrification. — La nitrification est la transformation des sels ammoniacaux en azotates. Elle s'effectue en permanence, et d'une façon pour ainsi dire insensible, dans le sol où les nitrates sont l'aliment azoté principal que consomment les végétaux.

Schlœsing et Müntz ont montré que les agents de cette nitrification sont des êtres vivants.

On remplit un cylindre de terre arable; à sa partie supérieure, on verse du sulfate d'ammoniaque; à sa partie inférieure, on recueille du nitrate d'ammoniaque. Toutefois, si on chauffe la terre à 100°, ou si on l'imprègne de chloroforme, le sulfate passe en nature, et la nitrification ne se fait plus. Celle-ci devait donc être produite par un organisme vivant. C'est Winogradsky qui eut le mérite de faire connaître le mécanisme de cette fermentation spéciale et les bactéries qui contribuent à l'assurer.

Elle s'effectue en deux temps, par deux sortes d'agents microbiens ayant chacun leur fonction.

Dans une première phase, les *ferments nitreux* : *Nitrosomonas* d'Europe, de Java, et *Nitrosococcus* du Mexique et du Brésil, *microcoques mobiles*, pourvus d'un cil, transforment les sels ammoniacaux en *nitrites*; dans une deuxième, ces nitrites sont transformés en nitrates par le *ferment nitrique*, le *Nitrobacter*, *bacille immobile*, découvert par Winogradsky.

Ces ferments nitreux et nitrique, qui ne peuvent se développer en présence de matières organiques, puisent leur alimentation dans les carbonates, dont ils absorbent le carbone.

La nitrification réclame une bonne aération, de l'humidité, une température de 5° à 50°, une alcalinité légère et de l'obscurité.

Ces phénomènes de nitrification ont reçu plusieurs *applications* intéressantes :

Müntz a pu reproduire des *nitrières artificielles* par l'action des microbes nitrifiants; c'est d'ailleurs par cette action que se sont produits dans la nature les vastes gisements de nitrate, et que se produisent en réduction, sur les murs humides, les dépôts de salpêtre qu'on y rencontre.

La nitrification a été utilisée pour assurer l'*épuration biologique des eaux*. Cette dernière s'effectue, on le sait, en deux phases : dans les fosses septiques où s'opèrent les fermentations anaérobies, puis dans les lits bactériens, siège des fermentations aérobies.

Dans les fosses septiques, les diastases microbiennes attaquent et décomposent les substances tertiaires et quaternaires. Les matières organiques qu'elles contiennent se dissolvent pour aboutir à la transformation en sels ammoniacaux.

Dans les lits bactériens où le contact de l'air est assuré par des agencements spéciaux, les ferments nitrobactériens assurent la transformation des sels ammoniacaux en nitrites, puis nitrates.

Dénitrification. — L'action des agents nitrificateurs est parfois anéantie par l'action des agents dits dénitrificateurs, qui ramènent les nitrates et les nitrites à l'état d'ammoniaque, en dégageant

du protoxyde d'azote, du bioxyde d'azote ou de l'azote seul. On trouve de ces bactéries dénitrifiantes dans la paille, la luzerne, les tourteaux, la bouse de vache. Elles agissent en présence de l'excès de matières organiques qui, on l'a vu plus haut, empêche la nitrification. On estime que la nitrification et la dénitrification se régularisent mutuellement et se font équilibre.

Putréfaction. — Ce sont encore des bactéries qui déterminent les phénomènes de putréfaction, consistant en une série de dédoublements des matières hydrocarbonées, azotées et sutout des albuminoïdes. Ces dédoublements aboutissent à la libération des éléments simples, oxygène, hydrogène, carbone, azote, sous forme d'acide carbonique et d'ammoniaque, qui sont ainsi restitués aux milieux d'où provenaient les matériaux ayant subi ces transformations.

Dans la putréfaction, on observe la dislocation des différentes substances, contenues dans le milieu.

Les hydrates de carbone se transforment, comme on l'a vu dans l'étude des diverses fermentations, après ou sans hydrolyse préalable, suivant leur qualité.

Les matières grasses sont dédoublées tout d'abord en glycérine et en acides gras : la glycérine fermente, les acides gras disparaissent, brûlés par l'action des moisissures.

Les matières azotées sont ou simplement solubilisées, ou disloquées; de ces phénomènes résulte le dégagement de produits gazeux, dont les uns, comme l'hydrogène et l'acide carbonique, restent inodores, dont les autres dégagent une odeur infecte : acides gras volatils, ammoniaques composées, mercaptan, hydrogène sulfuré, phosphoré, indol, scatol.

La putréfaction s'effectue en général en deux phases : la première due aux *aérobies*, la seconde aux *anaérobies*.

Soit un liquide qui se putréfie : sa masse est tout d'abord envahie par les aérobies qui y trouvent des aliments et de l'oxygène : ils s'y développent abondamment, brûlent les aliments qui y sont contenus, et dégagent des produits simples et inodores; au fur et à mesure que l'oxygène du milieu s'épuise, ils viennent se cantonner à la surface pour y absorber l'oxygène de l'air. Quand tout l'oxygène de la masse est épuisé, les anaérobies, protégés contre l'action de l'oxygène de l'air par le voile qui s'est formé, peuvent se développer en toute liberté; c'est alors qu'intervient la transformation spéciale d'où se dégagent les produits volatils d'odeur repoussante.

Il en est de même pour la putréfaction de la viande, où les aérobies s'attaquent surtout aux substances hydrocarbonées et un peu aux albuminoïdes, grâce à la présence des ferments peptolytiques et

protéolytiques mixtes. Après trois ou quatre jours, les anaérobies apparaissent; après une semaine environ, les sucres ont disparu, la glycérine est brûlée, les graisses sont devenues des savons ammoniacaux. Sous l'influence des ferments protéolytiques purs, le dégagement des produits volatils d'odeur infecte s'effectue. Après trois à quatre semaines, la décomposition s'avance davantage, et l'ammoniaque augmente de plus en plus, sous forme d'ammoniaques composées.

Ces phénomènes durent plus ou moins longtemps, mais finissent par aboutir à la disparition complète de la matière organique et à la nitrification.

FORMATION DE SUBSTANCES TOXIQUES.

Toxines proprement dites. — Les bactéries sont capables de sécréter des substances toxiques qui interviennent énergiquement dans la production des phénomènes morbides de l'infection qu'elles provoquent. On les a nommées « toxines ».

On classe les toxines en deux grands groupes : *toxines solubles* et *endotoxines*.

Toxines solubles. — Par leurs caractères généraux, elles se rapprochent assez étroitement des diastases.

Solubles dans l'eau et la glycérine, elles sont insolubles dans l'alcool; elles adhèrent fortement aux précipités et coagula que l'on provoque dans les liquides où elles ont pris naissance. Elles dialysent lentement, sont retenues en partie sur les filtres; comme les diastases encore, elles agissent à dose très minime. Elles sont sensibles à la lumière, à la chaleur, à l'oxydation.

Les toxines sont donc bien différentes des ptomaïnes avec lesquelles on a voulu les assimiler; elles diffèrent aussi des protéines bactériennes de Buchner, qui ne sont que des résidus de nutrition des bactéries, dénuées, contrairement aux toxines, de tout caractère de spécificité.

Les toxines diphtérique, tétanique, botulinique sont des types de toxines solubles.

Divers facteurs interviennent pour conditionner leur sécrétion :

Leur formation dépend tout d'abord du *microbe* producteur. Parmi les espèces virulentes, certaines sont toxigènes, d'autres ne le sont pas.

Elle dépend encore de la *constitution des milieux de culture*, variables d'ailleurs avec le microbe étudié. C'est ainsi que, pour donner une toxine active, le bacille tétanique a besoin de chlorures,

le bacille diphtérique de phosphates. Les sucres, en déterminant de l'acidité, sont nuisibles à la toxine diphtérique; par contre, ils n'influent en rien sur la toxine botulinique, dont le germe producteur ne souffre aucunement de cette acidité. — Enfin, dans la plupart des cas, la *réaction* du milieu doit être alcaline.

La température requise pour l'obtention des toxines est en général de 37°.

La résistance des toxines solubles à la chaleur est assez variable. A cet égard, on a classé un peu trop schématiquement les toxines en *thermolabiles* et *thermostabiles*. Ainsi les toxines diphtérique et tétanique sont atténuées par un chauffage à 55° et sont détruites à des températures inférieures à 100°.

Par contre les toxines cholérique et pyocyanique supportent impunément la température de l'ébullition.

Ces substances toxiques élaborées et sécrétées par les bactéries sont *spécifiques*. Ainsi les symptômes spasmodiques provoqués par la toxine tétanique sont bien différents de ceux que produit la toxine diphtérique, qui donne des troubles paralytiques.

Cette spécificité semble être due à l'*affinité élective* de chaque toxine, pour des éléments spéciaux de l'organisme. Les toxines en effet se fixent électivement sur certaines cellules; c'est la raison pour laquelle une dose infime de toxine peut être mortelle en se fixant sur des cellules dont le rôle physiologique est considérable : la cellule nerveuse, par exemple, dans le cas de la toxine tétanique. On a depuis longtemps comparé cette fixation à une véritable teinture ; c'est sans doute un phénomène d'adhésion moléculaire.

Chez l'homme ou l'animal infecté par le microbe qui les produit, les toxines solubles agissent surtout à distance ; l'exemple le plus typique est celui de la diphtérie et du tétanos où la lésion locale est infime, mais où les troubles toxiques prédominent, dus à la toxine lancée et diffusée dans la circulation.

Enfin ces toxines bactériennes, injectées à des animaux à doses progressivement croissantes, vaccinent ces derniers contre leur action nocive et déterminent la formation d'*antitoxines spécifiques*, dont nous parlerons dans des chapitres ultérieurs.

A cet égard, il faut établir un rapprochement entre ces toxines bactériennes et certaines *toxines végétales* comme l'*abrine* (jequirity), la *ricine* (graines de ricin), la *crotine* (*croton tiglium*). On a reconnu que ces substances, par leur nature et leurs propriétés, doivent être assimilées non pas aux albuminoïdes ni aux glucosides, mais aux toxines. Comme ces dernières d'ailleurs, elles peuvent provoquer la

formation d'antitoxines spécifiques, alors que les albuminoïdes et les glucosides en sont incapables,

Endotoxines. — Il est des microbes qui, dans les milieux de culture, ne libèrent pas de poison toxique tant qu'ils sont vivants, mais les retiennent dans le corps microbien. Ces endotoxines, comme on les a nommées, ne possèdent donc pas la propriété des toxines dites solubles. C'est à ce caractère essentiel qu'est due la distinction, peut-être artificielle, entre les unes et les autres.

Les principales endotoxines connues sont l'endotoxine pesteuse, typhique, dysentérique.

Leur existence peut être démontrée de la façon suivante : soit une culture jeune en bouillon de bacilles dysentériques de Shiga ; on la centrifuge ; après dépôt des microbes au fond du tube, on injecte à l'animal le bouillon devenu clair : il est inoffensif; on recueille le dépôt microbien que l'on tue par la chaleur à 58° pendant une heure; les microbes tués, injectés sous la peau d'un lapin, déterminent l'intoxication dysentérique expérimentale, comme les microbes vivants ; le corps microbien retient donc la toxine sans la laisser diffuser.

Il est vrai que cette endotoxine peut être mise en liberté dans une culture en bouillon, mais elle n'est décelable par ses effets pathogènes et ses réactions qu'après quinze à vingt jours de séjour à l'étuve à 37°, quand la plupart des bactéries sont mortes. Les corps microbiens, qui, à l'état vivant, retiennent leur poison, le laissent dégorger et diffuser après la mort et la destruction de la cellule bactérienne.

Avec des cultures solides, on peut obtenir la mise en liberté de ces endotoxines par les procédés produisant l'autolyse (macération aqueuse, congélation à l'air liquide par la méthode de Macfadyen et Rowland à — 90° F., procédé de Besredka avec une solution concentrée de chlorure de sodium, etc.).

De par leurs caractères généraux, elles ne semblent pas différer essentiellement des toxines solubles. Elles sont assimilables, comme ces dernières, aux diastases. Elles sont sensibles à la chaleur, mais avec des différences, suivant chacune d'elles, comme on l'a observé pour les toxines solubles.

Néanmoins, il est assez difficile d'établir une démarcation nette entre ces entodoxines et les toxines solubles. Pour certains auteurs, le fait que la toxine est diffusée dans le milieu ambiant ou retenue dans le corps microbien ne constitue pas un caractère suffisant pour faire admettre cette différenciation. La question de savoir s'il y a ou non identité de nature entre ces deux poisons n'est pas encore tranchée.

Enfin ces endotoxines peuvent fournir de l'anti-endotoxine quand elles sont injectées à doses progressives à l'animal ; mais alors qu'avec les toxines l'antitoxine est obtenue par injections sous-cutanées, les endotoxines ne peuvent donner d'anti-endotoxine qu'après injection intraveineuse (Besredka).

Tuberculine et malléine. — La tuberculine et la malléine sont des toxines qui méritent d'être classées dans une catégorie spéciale. Ce ne sont pas à proprement parler des toxines vraies, mais des extraits microbiens. On les extrait des corps bactériens par action de la glycérine.

Elles sont très résistantes à la chaleur. Enfin leur toxicité ne se manifeste que chez les sujets malades respectivement de tuberculose et de morve, en provoquant une réaction locale et une réaction générale.

Hémolysines. — En dehors des toxines proprement dites, les bactéries sécrètent des produits toxiques particuliers, exerçant leur action nocive sur les globules rouges ; on les nomme *hémolysines*. Elle possèdent la propriété de dissoudre les hématies, dissolution suivie de la diffusion de l'hémoglobine. On en connaît plusieurs variétés :

Une des mieux connues, la première qui ait été étudiée, est la *tétanolysine*, hémolysine sécrétée par le bacille du tétanos (Ehrlich et Madsen). Elle dissout les hématies de la plupart des animaux, surtout celles du lapin et du cheval.

Un chauffage à 50° pendant vingt minutes la détruit complètement. Substance très instable, elle est donc différente de la toxine tétanique vraie ou tétanospasmine. D'ailleurs, l'immunisation des animaux avec des cultures filtrées, contenant l'hémolysine et la toxine vraie, donne un sérum antitétanique et antihémolytique, mais ces antitoxines sont élaborées en quantités différentes : certains sérums en effet sont très antitoxiques et à peine antihémolytiques.

On connaît aussi une *staphylolysine*. A une culture de staphylocoque en bouillon, âgée de trois à quatre jours, on ajoute une goutte de sang défibriné de lapin ; après deux heures de séjour à l'étuve, puis dix-huit heures à la glacière, le sang est complètement dissous. Il en est de même quand on ajoute ce sang à une culture filtrée de staphylocoque. La staphylolysine injectée par voie sous-cutanée confère au sérum de l'animal des propriétés anti-hémolytiques ; par voie veineuse, celles-ci sont à peine marquées; elles sont nulles quand on prend la voie péritonéale.

On a décrit encore et étudié la *pyocyanolysine*, la *colilysine*, la *typholysine*, qui sont thermostabiles et ne se détruisent qu'à des températures fort élevées.

Besredka a fait connaître les propriétés de la *streptocolysine*, qui exerce son action non seulement *in vitro*, mais *in vivo*. Puis, contrairement aux hémolysines précédentes, qui n'apparaissent que dans les cultures déjà anciennes, la streptocolysine ne se manifeste que quand le streptocoque est en pleine activité ; elle diminue d'intensité quand la culture vieillit.

Kraus a fait connaître encore des *vibriolysines* qu'on observe avec des Vibrions voisins du Vibrion cholérique. L'expérience montre que certains Vibrions cholériques authentiques peuvent en sécréter.

Leucocidines. — Ce sont des produits toxiques pour les leucocytes. Van der Velde les a mises en évidence de la façon suivante : on injecte dans la plèvre d'un lapin du Staphylocoque doré ; un exsudat se forme, riche en leucocytes, mais dégénérés. Ces leucocytes, mis en présence de leucocytes normaux, altèrent ces derniers, en dissolvant le protoplasma tout d'abord, puis leur noyau. Un chauffage à 58° pendant dix à quinze minutes détruit cette leucocidine.

VIE SAPROPHYTIQUE ET ROLE PATHOGÈNE DES BACTÉRIES. L'INFECTION.

Des nombreuses bactéries que l'on rencontre dans la nature, les unes ne présentent pour l'être vivant aucune propriété nocive. Elles se contentent de pulluler aux dépens de la matière morte et sont des agents destructeurs énergiques des cadavres de végétaux et d'animaux. On les nomme des *bactéries saprophytes* (σαπρός, *putride*; φυτόν, *plante*). Elles agissent par leurs produits diastasiques pour déterminer les phénomènes, décrits plus haut, de fermentation, de putréfaction, de nitrification, etc. Par extension, on désigne habituellement sous le même nom des bactéries pouvant vivre, sans provoquer d'infection, dans les cavités naturelles de l'homme auxquelles elles ont accédé par l'intermédiaire de l'eau, des poussières, des aliments.

De ces bactéries, les unes sont douées de propriétés fermentatives et aideraient ainsi à l'action des ferments cellulaires, tout particulièrement dans l'intestin, où leur action diastasique assurerait la digestion de certaines substances alimentaires, notamment de la cellulose ; elles opéreraient une véritable digestion bactérienne, qui s'ajouterait à la digestion ordinaire. Certains auteurs préfèrent donner à ces germes l'épithète de « commensaux ». D'autres bactéries, saprophytes aussi, arrivent à pulluler dans les mêmes cavités naturelles, mais leur présence, inoffensive le plus souvent, peut ne pas l'être toujours, et certaines peuvent même, par association secondaire

avec d'autres, favoriser le pouvoir infectant de ces dernières.

En regard de ces bactéries saprophytes, se trouvent les bactéries capables d'infecter les organismes vivants qu'elles ont envahis, où elles pullulent, se développent et y produisent des désordres caractéristiques de l'infection et des toxi-infections. Ce sont les *bactéries pathogènes*.

De ces dernières il est plusieurs catégories : les unes semblent ne pouvoir vivre que dans les organismes vivants. Tombées d'un organisme vivant dans les milieux extérieurs, elles y restent à l'état de latence pendant un certain temps, puis succombent si elles n'ont pas l'occasion de pénétrer à nouveau chez un hôte où elles puissent reprendre leur vie active. Ce sont des *parasites obligés*. D'autres, au contraire, vivent de la vie saprophytique en dehors de l'être vivant, dans le sol, les eaux, où elles peuvent se multiplier, se diviser ou prendre une forme de résistance qui leur permet d'attendre souvent des mois et des années l'occasion favorable à une nouvelle vie infectante. Ce sont les *parasites facultatifs*.

Ces derniers exemples montrent qu'un seul et même microbe peut, à l'occasion, se comporter en saprophyte ou en pathogène. Il est vraisemblable d'ailleurs que certains saprophytes se transforment en pathogènes; n'admet-on pas aujourd'hui que beaucoup de pathogènes ont été élevés à cette dignité, de saprophytes qu'ils étaient primitivement, par adaptations successives aux milieux vivants dans lesquels ils ont été appelés à pénétrer progressivement ? D'ailleurs, H. Vincent a, par des moyens spéciaux, pu conférer le pouvoir pathogène à des bactéries saprophytes, le *Bacillus subtilis*, le *B. mesentericus vulgatus*.

Les bactéries pathogènes engendrent donc l'infection; mais pour que celle-ci puisse se produire, diverses conditions relevant du microbe et de l'organisme qui l'héberge doivent être réalisées.

Conditions relevant du microbe. — La ***virulence*** des germes est un facteur de haute importance. Elle peut être définie : « L'aptitude des microbes à se développer dans le corps des animaux et à y sécréter des substances toxiques » (Roux).

Cette virulence est variable suivant diverses conditions naturelles et expérimentales.

Elle diminue sous l'influence de l'air, de la lumière, de la dessiccation, des antiseptiques, de la chaleur, du vieillissement dans les cultures. Elle augmente quand on fournit à un germe les aliments qui lui conviennent le mieux, quand on l'habitue, par adaptation progressive à un organisme déterminé, par exemple en le faisant vivre à l'abri des défenses de cet organisme, dans les sacs de collo-

dion introduits dans le péritoine. Ces passages successifs exaltent le pouvoir pathogène, mais seulement pour l'espèce à laquelle il a été habitué. Ces conditions expérimentales sont parfois réalisées naturellement au cours des épidémies. Il est de règle qu'au début de certaines épidémies, de choléra par exemple, les premiers cas sont bénins, puis surviennent des atteintes bien caractérisées, des formes graves et enfin des formes foudroyantes. Au fur et à mesure des passages, la virulence s'est accrue.

Dans le déterminisme des infections, la *quantité de microbes* pénétrant dans l'organisme doit entrer encore en ligne de compte. Avec certaines espèces de germes, il suffit d'un microbe pour réaliser l'infection; avec d'autres, une grande quantité est nécessaire. Le fait a été remarquablement mis en lumière par Chauveau dans ses expériences sur le mouton algérien; bien que réfractaire au charbon dans les conditions naturelles, s'il reçoit cependant une forte dose de cultures, il contracte l'infection.

En médecine expérimentale, on sait aussi que l'injection d'une dose infime de germes peut n'être suivie d'aucun effet; une dose plus forte peut provoquer une infection locale, un abcès, et une dose beaucoup plus forte produire une septicémie. La quantité influe encore sur la gravité de l'infection et sur la durée de l'incubation.

Le rôle joué par les *associations microbiennes* est indiscutable : si on inocule à un animal des spores tétaniques sans toxine, il ne contracte pas le tétanos; si à ces spores on associe certains germes saprophytes, le tétanos se déclare; dans le premier cas, la spore a été phagocytée; dans le second, les leucocytes se sont emparés de la bactérie banale et ont laissé libre la spore, qui a eu le temps de germer et de lancer la toxine dans la circulation. Cet exemple n'est pas le seul; on connaît le pouvoir favorisant du Streptocoque sur le bacille de Löffler, le bacille d'Eberth, dont la virulence est accrue par ce fait; il en est de même du choléra : Metchnikoff a montré le rôle des bactéries favorisantes ou au contraire empêchantes sur son éclosion.

Le rôle de la *porte d'entrée* des microbes pathogènes n'est pas négligeable. Le même germe, suivant sa voie d'introduction, produira des effets différents et de gravité variable; la pénétration du bacille tuberculeux par les voies respiratoires est plus sûrement tuberculisante que par les voies digestives : le chancre syphilitique extragénital donne une syphilis plus grave que s'il se développe sur les organes génitaux; la variole congénitale est très grave, car elle résulte d'une inoculation sanguine, etc. Inoculé au niveau de la

peau, le streptocoque donne un érysipèle, dans les veines une septicémie, etc.

Influence du terrain. — Il faut d'abord compter avec l'état réfractaire que présentent naturellement certains organismes vis-à-vis de tel ou tel microbe ; nous étudierons plus loin ces phénomènes d'*immunité*.

L'*âge* est une condition individuelle qui influe sur la réceptivité. C'est assurément l'enfance qui, d'une façon générale, est la plus apte à contracter les maladies infectieuses; le fait est notoire pour les fièvres éruptives. Suivant l'âge encore, telle infection présente une gravité variable ; la fièvre typhoïde notamment, bénigne dans l'enfance, est plus maligne à l'âge adulte. En d'autres infections, la proposition est renversée.

Le *sexe* intervient encore, mais surtout en raison des occupation et travaux réservés soit à l'homme, soit à la femme.

L'influence de la *race* est à considérer encore; on connaît la faible réceptivité des noirs pour le paludisme, la fièvre jaune; l'extrême réceptivité des blancs pour la scarlatine, etc.

Une grande influence doit être attribuée à l'*état de maladie* : « Le meilleur moyen de se bien porter, a-t-on dit, est de ne pas être malade. » A cet égard, les troubles des viscères interviennent à un haut degré : troubles de l'estomac, du cœur, lésions de la rate, du foie destructeur des poisons, du rein chargé de les éliminer, de l'intestin, etc. Les intoxications et les auto-intoxications sont des éléments essentiellement favorisants; de même l'*insuffisance alimentaire*, qui déprime l'organisme et permet aux microbes, qui l'envahissent ou y préexistent, de devenir pathogènes; on connaît le rôle marqué de la *famine* sur l'éclosion et le développement des épidémies. L'influence du *surmenage* est actuellement classique : elle est observée couramment en pathologie humaine (fièvre typhoïde, tuberculose, etc.) et animale (morve, etc.). L'influence des agglomérations, de l'*encombrement*, est encore indéniable ; elle agit en multipliant les contacts et en privant les individus du cube d'air qui leur est nécessaire.

A ces facteurs individuels s'ajoutent encore des conditions extrinsèques.

Le *froid* est à envisager dans bon nombre de cas ; son influence favorisante sur l'éclosion de la tuberculose, de la méningite cérébro-spinale est connue ; il agit en diminuant ou en annihilant le rôle défensif des leucocytes, des muqueuses, des épithéliums. L'expérience de Pasteur sur la poule, réfractaire au charbon, en est une preuve manifeste; qu'on lui plonge les pattes dans l'eau froide après une

inoculation de bactéridie charbonneuse, elle succombe au charbon. L'influence de la ***chaleur*** doit en être rapprochée, quoique plus complexe, car divers éléments agissent sur la diminution de la phagocytose. Ajoutons les influences météoriques, climatiques, etc.

Le ***traumatisme*** est invoqué, à juste titre, dans l'éclosion de certaines infections restées latentes, qu'il réveille et appelle aux régions où il se produit (tuberculose, pleurésie et péritonite tuberculeuses, pneumonie traumatique, etc.). Il en est de même de l'*altération mécanique des épithéliums*; une excoriation de la muqueuse pharyngée ou une lésion préalable produite par un germe quelconque préparent la muqueuse à des diphtéries secondaires; la grippe, la rougeole, la scarlatine, par leurs localisations sur les muqueuses, agissent de même pour favoriser l'éclosion de nouvelles infections spécifiques, greffées sur la première.

Dans cette lutte entre la graine et le terrain, l'organisme met en jeu ses défenses naturelles par les muqueuses, les sécrétions glandulaires, dont on connaît le pouvoir destructeur des germes et des toxines (salive, sucs gastrique, pancréatique, intestinal); il en est de même du foie, de la rate, de l'épiploon, sans oublier le rôle général joué par les leucocytes, comme l'a démontré Metchnikoff dans la production de l'immunité à l'étude de laquelle nous sommes ainsi tout naturellement amenés.

CHAPITRE III

IMMUNITÉ

L'organisme humain ou animal est en lutte constante avec les nombreux agents morbigènes venus de l'extérieur qui y accèdent pour y pulluler et y déterminer l'infection : quand de cette lutte l'organisme sort victorieux, la maladie ne se produit pas ; on dit qu'il est immunisé.

L'immunité peut donc être définie : cet état de l'organisme qui présente la faculté de s'opposer à l'action d'un agent pathogène quelconque, parasite ou poison.

Elle est innée ou acquise.

Immunité naturelle. — On connaît maints exemples d'immunité naturelle : alors que le mouton de nos pays est si sensible au charbon, le mouton algérien y est réfractaire ; la poule est réfractaire au charbon et au tétanos, les bovidés et les porcs à la morve, etc.

De même encore le hérisson est insensible à l'action du venin de vipère ; l'atropine est inoffensive pour le lapin, la nicotine pour la chèvre, etc.

Cette immunité innée peut être fonction de l'espèce, de la race, de l'âge.

L'*espèce* humaine contracte des infections auxquelles les animaux restent réfractaires, et inversement.

Certaines *races* sont naturellement insensibles à l'action de certains virus : la race noire est, en général, réfractaire à la fièvre jaune ; chez les nègres comme chez les Annamites, les Malgaches, les Hindous, la malaria est moins sévère que chez le blanc.

L'influence de l'*âge* entre en ligne de compte. Au cours des épidémies de rougeole, de scarlatine, les enfants de moins d'un an sont habituellement épargnés ; le bacille typhique respecte aussi en général les jeunes enfants et les vieillards. En pathologie animale, on observe des exemples semblables.

Enfin, dans ces états « immuns », il faut distinguer les faits d'*immunité absolue* et d'*immunité relative*.

Dans les premiers, l'être vivant est réfractaire à un virus, quelle qu'en soit l'activité, et quelle que soit la déchéance organique; par exemple, l'état d'immunité du bœuf vis-à-vis de la morve.

Dans les secondes, l'immunité peut être vaincue en certaines circonstances; il suffit parfois pour cela d'augmenter la virulence d'un germe ou d'accroître la réceptivité de l'organisme.

Immunité acquise. — L'immunité peut s'acquérir à la suite de certaines infections : l'homme est ainsi vacciné contre la fièvre typhoïde, la variole, la rougeole, la scarlatine, les oreillons, la fièvre jaune, quand il en a subi une première atteinte. Les atteintes frustes, bénignes, confèrent l'immunité comme les atteintes graves. Au cours d'épidémies, certains organismes jouissent d'une immunité, qui ne peut être expliquée que par de tels faits.

A côté de ces infections immunisantes pour une longue durée, d'autres se caractérisent par une immunité assez passagère; d'autres enfin, comme l'érysipèle, la pneumonie, etc., ne confèrent aucune immunité; bien plus, elles sont plus sensibilisantes que vaccinantes.

L'immunité acquise peut être provoquée par des inoculations successives de virus vivants, atténués par la chaleur ou par le vieillissement de cultures, ou de virus morts. Le type de ces vaccinations microbiennes est fourni par la vaccination antityphique, antipesteuse, anticholérique, etc. Elles provoquent des réactions locales et générales amenant, au bout de quelques jours, l'immunité cherchée. Rappelons encore la vaccination jennérienne contre la variole déterminée par la vaccine. Les inoculations de poisons, de toxines microbiennes peuvent provoquer ce même état réfractaire.

Cette immunité acquise par une infection antérieure, contractée spontanément ou provoquée par l'action de virus ou de poisons inoculés, est dite *immunité active*.

En regard, on connaît l'*immunité passive*, conférée par l'inoculation du sérum d'animaux ou d'individus immunisés; en ce cas, on introduit dans l'organisme des substances qui permettent à l'organisme de lutter efficacement contre l'envahisseur. C'est le principe général de la sérothérapie dont on reparlera à maintes reprises.

NOTIONS SOMMAIRES SUR LE MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ.

Il n'est pas de question qui ait soulevé autant de discussions que celle du mécanisme de l'immunité. Avant que les notions que l'on possède actuellement sur ce sujet soient bien admises, de nom-

breuses théories ont été émises. Nous signalerons les principales d'entre elles, intéressantes au point de vue historique.

Théorie de l'épuisement du milieu. — Cette théorie, d'ordre chimique, avait été soutenue par Pasteur, lors de ses recherches sur le choléra des poules. Il pensait que, chez la poule vaccinée contre cette infection, celle-ci ne se produisait pas parce que l'organisme ne fournissait plus au virus les substances nécessaires à son développement. D'ailleurs il avait remarqué que le germe spécifique ne pouvait pulluler dans le bouillon où il avait déjà vécu. Si cependant on additionnait ce bouillon filtré de bouillon neuf, une semence nouvelle pouvait y prospérer. Pour lui, ces phénomènes observés *in vitro* et *in vivo* étaient du même ordre.

En réalité, cette théorie ne pouvait expliquer l'immunité naturelle, et en particulier ce fait que le mouton d'Algérie, réfractaire au charbon, peut prendre l'infection si on lui injecte de très fortes doses.

Théorie de Chauveau. — Chauveau pensait que l'immunité était due à l'addition au milieu organique de substances nuisibles, dont la diffusion devait empêcher le développement ou la vie du microbe.

L'immunité n'est pas encore expliquée par cette théorie, puis ne sait-on pas que la bactéridie charbonneuse pullule dans le sang des animaux vaccinés contre elle? Il en est de même, au moins pendant quelques heures, dans l'humeur aqueuse des animaux réfractaires.

Théorie humorale.

Pour les partisans de la théorie humorale, l'immunité est due à des propriétés spéciales du sang et des autres humeurs de l'organisme, indépendantes de toute action cellulaire, nuisibles pour les bactéries contre lesquelles l'animal a été vacciné.

Théorie bactéricide des humeurs. — Fodor avait remarqué, en 1886, que les germes saprophytes, comme le *B. subtilis*, le *B. megaterium*, etc., injectés dans la circulation, disparaissaient rapidement du sang. Le sang devait donc avoir des propriétés bactéricides élevées.

En 1888, Nuttal, reconnaissant que les globules blancs jouent un rôle important dans la destruction des bactéries, estime néanmoins que cette action est préparée par une altération préalable des mêmes bactéries par les humeurs organiques ; il accorde à ces dernières une action prépondérante.

Buchner, en 1889, répète et complète ces expériences, et il observe

que les bactéridies charbonneuses ensemencées en sang défibriné de lapin ou de chien diminuent rapidement de nombre. Cette diminution existe déjà chez des animaux réceptifs; elle est beaucoup plus considérable chez les animaux vaccinés. Il attribue ces propriétés bactéricides à une substance qu'il nomme *alexine*.

C'est cette théorie bactéricide des humeurs que Pfeiffer invoquait pour expliquer la destruction du Vibrion cholérique, injecté dans le péritoine des animaux vaccinés contre ce germe. D'après lui, l'immobilité des Vibrions qui en résultait, de même encore leur transformation en granules, ne pouvaient relever que de cette propriété.

Des travaux auxquels cette théorie a donné naissance, il résulte qu'elle ne saurait être généralisée. Certains faits se trouvent d'ailleurs en contradiction formelle avec elle.

Par exemple : ensemençons de la bactéridie charbonneuse dans le sang d'animaux réfractaires au charbon, comme la poule, le chien : la bactéridie y pousse abondamment; de même si la culture est effectuée dans le sang de mouton vacciné contre cette infection.

D'autre part, le sang de lapin, très réceptif au charbon, est très bactéricide pour la bactéridie. Il en est de même pour le sang du cobaye vis-à-vis du *Vibrio Metchnikowi*, auquel il est très sensible. Kionka a montré en outre que le sérum d'un typhique prélevé avant la mort est très bactéricide pour le bacille d'Eberth.

Enfin, Pfeiffer, Metchnikoff ont montré le défaut de parallélisme existant entre les résultats de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, le sérum d'un animal vacciné contre *Vibrio Metchnikowi* est très bactéricide *in vitro* contre ce dernier (il le tue en quelques heures); par contre, ce même germe, introduit sous la peau de l'animal qui a fourni ce sérum si actif, y reste vivant et virulent après quatre jours.

Théorie du pouvoir atténuant des humeurs. — Bouchard, Charrin et Roger pensent que les bactéries, sous l'influence des humeurs de l'organisme, sont rendues inoffensives et incapables de produire une maladie grave.

Ils ensemencent du streptocoque, du pneumocoque, du pyocyanique dans le sérum d'animal vacciné contre ces germes. Ces derniers perdent alors leur virulence et deviennent difformes et granuleux.

A deux lapins, l'un neuf, l'autre vacciné, ils injectent du bacille pyocyanique; après cinq à dix minutes, ils prélèvent du sang. Le sang du lapin neuf tue un autre animal; celui du lapin vacciné ne tue pas. Par conséquent, disaient Charrin et Roger, dans le premier cas le germe n'avait pas été atténué, dans le second il l'avait été.

Mais ce qui peut être vrai pour le pyocyanique ne l'est pas pour toutes les bactéries. Puis certaines, comme la bactéridie charbonneuse, loin de s'atténuer en passant par un organisme réfractaire, se renforcent : la bactéridie charbonneuse, injectée au lapin vacciné ou à un animal réfractaire, devient en effet plus virulente.

On sait encore que les spores tétaniques ne sont nullement atténuées par le séjour dans l'organisme d'un animal réfractaire.

Théorie antitoxique. — Cette nouvelle théorie prit naissance du jour où Behring et Kitasato découvrirent le pouvoir antitoxique du sérum d'animaux immunisés contre la toxine tétanique et la toxine diphtérique. Ces auteurs conçurent alors l'immunité de la façon suivante : le sérum de ces animaux devait contenir une substance neutralisant les toxines, capable de s'opposer à leurs effets nocifs, agissant comme un acide vis-à-vis d'une base. Et en effet, un tel sérum injecté à un animal neuf prévient l'infection diphtérique et tétanique, en neutralisant la toxine élaborée par les microbes.

Cette propriété neutralisante n'existerait pas que chez les animaux vaccinés : Wassermann a montré que le sérum d'enfants ou d'adultes n'ayant jamais contracté la diphtérie est antitoxique à un certain degré vis-à-vis de la toxine diphtérique. Il a obtenu l'immunité du cobaye avec 39 échantillons de sérum sur 51.

A cette conception on a fait de graves objections :

Tout d'abord la diphtérie et le tétanos sont des infections spéciales, où la toxine élaborée joue le principal rôle, et très différentes des autres infections connues.

Puis le sang d'animal réfractaire au tétanos ou à la diphtérie n'est pas antitoxique. Ainsi Vaillard a montré que le sérum de la poule, réfractaire au tétanos, ne neutralise pas la toxine tétanique; il en est de même du sang de rat réfractaire au charbon : Seraphini et Enriquez l'ont injecté à des animaux réceptifs ; ils n'ont jamais pu les protéger contre l'infection charbonneuse. Il en est de même avec le sérum de rat, réfractaire à la diphtérie, vis-à-vis du bacille de Löffler.

Le sérum de ces animaux réfractaires peut acquérir des propriétés antitoxiques sous l'influence d'inoculations vaccinantes, mais le sang d'animaux neufs ne les possède pas.

La théorie ne saurait donc expliquer l'immunité naturelle. Tout au plus pourrait-elle s'appliquer à quelques cas particuliers d'immunité acquise, notamment ceux que Behring a envisagés pour la diphtérie et le tétanos. Et cependant une expérience de Roux devenue classique oblige à repousser cette action neutralisante et destructive des antitoxines sur les toxines correspondantes ; en effet :

des cobayes *neufs* qui reçoivent le mélange sérum et toxine restent bien indemnes ; mais, si l'on utilise des cobayes qui ont été antérieurement soumis à l'inoculation de cultures diverses (Colibacille, *M. prodigiosus*, Vibrion cholérique, etc.), ils succombent avec les lésions et les symptômes de l'intoxication diphtérique ou tétanique. Il en est de même des animaux qui, ayant résisté au mélange sérum antitétanique et toxine tétanique, reçoivent ultérieurement des produits d'autres microbes ; ils contractent le tétanos alors que les témoins restent indemnes.

Par conséquent, chez les cobayes neufs envisagés plus haut, la toxine inoculée n'avait pas été détruite par le sérum, ni neutralisée comme une base par un acide.

Il en est de même encore dans l'expérience de Calmette sur le sérum antivenimeux et le venin des serpents. Chauffé à 68°, le sérum perd son pouvoir antitoxique, alors que le venin conserve sa toxicité. On mélange *in vitro* sérum et venin, puis on chauffe ce mélange à 68° pendant trente minutes. Les animaux inoculés avec le mélange non chauffé résistent ; ceux qui ont reçu le mélange chauffé succombent. Par conséquent, on ne saurait admettre une combinaison chimique entre le sérum et le venin pour former une substance inoffensive, ou bien, si elle existe, elle est bien instable.

Nous verrons ultérieurement que l'on peut interpréter le pouvoir antitoxique d'une autre façon : Roux, Metchnikoff pensent en effet que l'antitoxine pourrait agir en stimulant les éléments cellulaires de l'organisme pour les rendre capables de résister à l'action des toxines.

Théorie cellulaire.

Pour Metchnikoff, dont le nom est étroitement lié à cette théorie, l'immunité est due à des réactions cellulaires; elle n'est qu'un cas particulier de la résorption des éléments figurés en général.

Résorption des éléments figurés. — Metchnikoff avait montré autrefois que, chez les Spongiaires, les substances alimentaires, après avoir pénétré par les ouvertures si nombreuses à la surface des éponges, étaient saisies par les cellules vibratiles ou amiboïdes qui englobaient ces substances et leur faisaient subir une digestion intracellulaire. Ces cellules, il les avait nommées *phagocytes*.

Ce phénomène peut être observé par l'expérimentateur qui introduit dans un organisme des cellules quelconques.

En effet, injectons dans le péritoine de cobaye du sang défibriné d'oie ; au bout de deux à trois heures, il se produit dans la cavité

péritonéale une inflammation aseptique révélée par l'exode d'une foule de leucocytes (polynucléaires, mais surtout grands mononucléaires). Les mononucléaires, que Metchnikoff dénomme « macrophages » (par opposition aux polynucléaires dits « microphages ») poussent des prolongements qu'ils fixent sur la paroi des hématies. Saisie par ces pseudopodes, l'hématie pénètre dans le macrophage, où elle subit des modifications importantes : l'hémoglobine diffuse, le corps protoplasmique se digère ; le noyau persiste tout d'abord, puis se divise en fragments qui finissent par disparaître au bout de quelques jours. Après avoir séjourné dans le péritoine, les macrophages quittent cette séreuse et vont achever leur digestion dans l'épiploon, les ganglions mésentériques, le foie et la rate.

On peut répéter la même expérience avec des cellules de tissus divers : tissu hépatique, nerveux, etc. Les spermatozoïdes conviennent très bien pour la démonstration ; toutes ces cellules sont d'abord englobées, puis digérées par les macrophages.

Ces phénomènes de digestion intracellulaire sont dus à une action fermentative produite par un ferment, peut-être une diastase, que Buchner a nommée *alexine* ; Ehrlich, *complément*, et Metchnikoff *cytase*. Ces faits traduisent l'effort naturel d'un organisme neuf pour résister à l'invasion des cellules étrangères et les éliminer ; mais quand l'introduction des mêmes cellules est répétée, l'organisme envahi ainsi à plusieurs reprises acquiert vis-à-vis d'elles des propriétés nouvelles.

En effet, dans les expériences précédentes sur le cobaye, les macrophages seuls se chargeaient de digérer les hématies d'oie ; le liquide péritonéal et le sérum n'avaient aucune action hémolytique. Mais, si l'on injecte une deuxième et une troisième fois le sang d'oie dans le péritoine des mêmes cobayes, le plasma péritonéal devient hémolytique ; de plus, le sérum mélangé *in vitro* avec les hématies d'oie les agglutine et les hémolyse.

C'est en effet une loi générale que Bordet a bien mise en évidence : l'injection de sang d'une espèce de Vertébrés dans le péritoine ou sous la peau d'un animal d'*espèce différente* confère toujours au sérum de celui-ci la propriété d'hémolyser les globules rouges injectés. En outre, la *substance hémolysante* ne dissout que les hématies de l'espèce qui a fourni le sang injecté.

L'explication du phénomène, donnée par Bordet, est la suivante : Le sérum des animaux traités par du sang d'espèce étrangère renferme *deux substances distinctes qui n'agissent sur les hématies pour les dissoudre que lorsqu'elles sont réunies*. L'une est l'*alexine* (Bordet, Buchner), ou *complément* (Ehrlich), existan. dans tout sérum, même

normal, et disparaissant par le chauffage à 56° pendant trente minutes; l'autre ne se trouve que dans les sérums d'animaux « préparés » par des injections répétées ; elle résiste au chauffage; on la nomme *sensibilisatrice* (Bordet), *substance intermédiaire* ou *amboceptеur* (Ehrlich), *philocytase* (Metchnikoff); ainsi par exemple :

Dans un tube à essai (fig. 14), on verse le sérum *non chauffé*, contenant par conséquent l'alexine et la sensibilisatrice, puis les hématies. La dissolution hémolytique ne tarde pas à s'effectuer.

Dans un deuxième tube, on verse le même sérum *chauffé*, dépourvu par conséquent d'alexine, mais contenant la sensibilisatrice. Les hématies s'agglutinent, mais restent intactes; l'hémolyse ne se produit pas. Si cependant on ajoute à ce mélange quelques gouttes de sérum neuf, la dissolution des hématies s'effectue (tube n° 3).

Dans ces expériences on admet que la sensibilisatrice se fixe sur les hématies et qu'elle entraîne la fixation de l'alexine sur les mêmes éléments, cette dernière fixation étant indispensable pour amener la dissolution des hématies.

Pour Bordet, l'alexine s'attacherait à l'hématie « sensibilisée » comme une matière colorante s'attache à un élément mordancé.

Immunité dans les maladies infectieuses. — Résorption des bactéries. — L'immunité dans les maladies infectieuses, naturelle ou acquise, s'explique, d'après Metchnikoff, par des phénomènes identiques, la résorption s'opérant cette fois sur les bactéries envahissant l'organisme.

Immunité naturelle. — Il avait déjà mis en évidence cette résorption phagocytaire chez les Daphnies.

Les Daphnies sont sujettes au parasitisme d'une levure (*Monospora*) dont les spores pénètrent dans leur tube digestif; elles traversent les parois intestinales pour se rendre dans l'intérieur du corps. Immédiatement après, les leucocytes entourent les spores et les englobent; la surface de la spore, lisse et régulière, devient échancrée et onduleuse; la spore se détruit, et il n'en reste plus dans le leucocyte que des débris informes ; elle a donc subi une digestion qui a abouti à sa destruction; la Daphnie qui a été ainsi infectée reste indemne et bien portante. En d'autres circonstances, si les leucocytes n'ont pas englobé la spore dès son invasion, la spore germe et sécrète un poison qui éloigne les phagocytes; les parasites se mettent à pulluler, et l'animal succombe.

Cette expérience, devenue classique, a été le point de départ d'une foule de recherches : Metchnikoff et ses collaborateurs injectèrent des bactéries diverses à l'animal et comparèrent l'évolution des

phénomènes chez les animaux sensibles et les animaux naturellement réfractaires.

Chez un animal réceptif au charbon, comme le lapin, on fait une injection sous-cutanée de culture charbonneuse ; après quelques heures, l'examen de l'exsudat œdemateux qui s'est formé révèle une pullulation intense de bactéridies et la rareté des leucocytes contenus dans le liquide d'œdème ; les bactéridies sont libres ; elles passent dans la circulation et entraînent la mort.

Chez un animal réfractaire (grenouille, poule, chien, etc.), voici ce qu'on observe : l'examen de l'exsudat qui suit l'inoculation montre qu'après un certain temps, toutes les bactéridies sont englobées dans les cellules phagocytaires. Si, par contre, on diminue artificiellement la résistance de l'animal (maintien de la grenouille à 37° ; immersion des pattes d'une poule dans l'eau froide ; chez le chien, ablation de la rate, riche en phagocytes), l'englobement leucocytaire ne se produit plus, la bactéridie pullule et l'animal succombe au charbon.

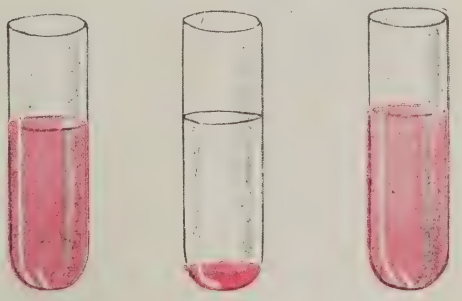

Fig 14.

Tube n° 1.	Tube n° 2.	Tube n° 3.
1° Sérum hémolytique antimouton *non chauffé*.	1° Sérum hémolytique antimouton *chauffé* à 55°.	1° Sérum hémolytique antimouton *chauffé* à 55°.
2° Hématies de mouton.	2° Hématies de mouton.	2° Hématies de mouton.
		3° Alexine.
Hémolyse.	Pas d'hémolyse.	Hémolyse.

Les mêmes résultats s'observent quand on injecte au cobaye, par voie péritonéale, le spirille de la septicémie des oies (Metchnikoff), ou le spirille de la fièvre récurrente (Sawtchenko), à l'action pathogène desquels cet animal est réfractaire. Au bout de quelques heures, les spirilles sont englobés par les leucocytes faisant issue dans le péritoine.

Avec le bacille typhique, le Vibrion cholérique et une foule d'autres germes, les mêmes phénomènes ont été notés.

Il s'opère donc ici, comme pour les hématies dans les expériences ci-dessus exposées, une résorption due à l'activité des phagocytes appelés par la présence de l'envahisseur.

Quels sont les éléments cellulaires capables d'effectuer cet englobement microbien ?

On a vu plus haut que les hématies et les cellules de l'organisme en général étaient englobées par les grands mononucléaires, dits macrophages. Metchnikoff a montré que c'étaient les polynucléaires ou *microphages*, de préférence aux précédents, qui se chargeaient d'englober et de digérer les bactéries. D'ailleurs, quand, au cours de l'expérimentation, on obtient un exsudat riche en polynucléaires (microphages), celui-ci a des propriétés bactéricides ; si, au contraire, on arrive à provoquer un exsudat riche surtout en macrophages (ce qu'il est possible de réaliser en injectant dans la plèvre du chien du gluten-caséine, comme l'ont fait Gengou et Tarassevitch), cet exsudat n'est pas bactéricide.

Ici encore, comme dans la résorption des éléments figurés, la digestion intracellulaire s'opère par un ferment, la *cytase*, et dans le cas particulier la *microcytase* (Metchnikoff) issue des microphages, par opposition à la *macrocytase*, issue des macrophages.

Pour Metchnikoff donc, l'immunité naturelle se résume dans une action phagocytaire qui s'exerce sans avoir besoin du concours, même préalable, des humeurs sur les microbes vivants et virulents. Le pouvoir bactéricide du sérum, invoqué par nombre d'auteurs, n'intervient qu'à la suite du dégagement de la microcytase échappée des leucocytes, lors de la coagulation du sang.

Immunité acquise. — Injectons un germe donné sous la peau d'un lapin réceptif et d'un lapin vacciné contre ce même germe :

Chez le lapin réceptif, l'exsudat qui se développe montre une pullulation marquée des bactéries restées libres et l'absence de leucocytes.

Chez le lapin vacciné au contraire, après l'inoculation l'exsudat devient riche en leucocytes, et la phagocytose, suivie de la digestion intracellulaire du germe, s'exerce avec intensité.

Ces phénomènes sont donc calqués sur ceux que révèle l'expérience sur un animal réfractaire. Mais dans le sérum et les humeurs de l'animal vacciné se développent des propriétés nouvelles, analogues à celles qui ont été décrites chez les cobayes qui ont reçu à plusieurs reprises les hématies d'oie. Le sérum, en effet, devient agglutinant, bactériolytique ; de plus il devient préventif.

L'AGGLUTINATION ne présente aucune importance dans la production de l'immunité acquise. C'est une réaction d'infection et non d'immunité.

La BACTÉRIOLYSE, analogue à la cytolyse, qui amène la dissolution des hématies dans les expériences précitées, s'effectue grâce à l'action

combinée d'une *sensibilisatrice spécifique* ou *fixateur spécifique* qui prend naissance dans ce sérum, et de l'*alexine* ou *cytase* qui y préexiste. Bordet et Gengou ont mis ce phénomène en évidence de la même manière qu'avec les éléments cellulaires, les globules rouges notamment.

Pour Metchnikoff et ses collaborateurs, tous ces phénomènes de bactériolyse reconnaissent une origine leucocytaire. Cette opinion a été vivement combattue par Pfeiffer, qui a pensé pouvoir démontrer que la destruction extracellulaire des Vibrions cholériques dans le péritoine de cobayes vaccinés contre ces germes s'effectuait en dehors de toute action phagocytaire. Voici l'expérience dite *phénomène de Pfeiffer* :

Dans le péritoine d'un cobaye neuf et d'un cobaye vacciné contre le Vibrion cholérique, on introduit une même dose d'une émulsion de ce germe. Dix minutes après, on prélève par ponction capillaire un peu d'exsudat péritonéal de chacun de ces animaux. Chez le cobaye neuf, les Vibrions sont perceptibles en grand nombre ; ils ont conservé leur forme et leur mobilité : les animaux succombent ultérieurement. Chez le cobaye vacciné, ils ont subi des modifications profondes : leur mobilité a disparu ; de plus, la plupart sont agglutinés et ont perdu leur forme vibrionienne pour prendre l'aspect de granules fixant plus ou moins la couleur ; les animaux survivent.

Pfeiffer attribue ces altérations graves des Vibrions à l'action nocive pure et simple de l'exsudat péritonéal. Metchnikoff répond à cette interprétation par les observations suivantes :

Quand on mélange *in vitro* une goutte de sérum frais de cobaye vacciné avec une émulsion de Vibrions cholériques, la transformation en granules s'obtient ; mais une fois chauffé, il perd cette propriété. C'est sans doute parce que ce chauffage a fait disparaître la microcytase ; en effet, si on ajoute au mélange une goutte de lymphe péritonéale normale, contenant des leucocytes, incapable par elle-même de reproduire le phénomène, la transformation granuleuse s'opère : on obtient les mêmes résultats en ajoutant du sérum neuf (Bordet). Par conséquent, le phénomène de Pfeiffer est dû à l'action simultanée d'une *substance fixatrice* développée dans les humeurs de l'animal vacciné, et de l'*alexine* ou *cytase*. Metchnikoff a démontré que cette cytase était mise en liberté dans le péritoine par les leucocytes subissant une destruction intense (phagolyse) dès l'inoculation de l'émulsion microbienne (les leucocytes sont en effet très rares dans l'exsudat péritonéal). Ce qui le prouve, c'est qu'en supprimant cette phagolyse par injection préalable de

bouillon renforçant la résistance des leucocytes, la transformation en granules ne se produit pas.

Par conséquent, dans ce phénomène de Pfeiffer, qui montre la destruction extracellulaire du Vibrion, celle-ci relève bien du pouvoir bactéricide de la lymphe péritonéale, mais elle est encore en relation directe avec un acte cellulaire.

En dehors du pouvoir bactéricide attribué à sa véritable origine, le sérum des animaux vaccinés présente encore des PROPRIÉTÉS PRÉVENTIVES :

Richet et Héricourt ont montré les premiers que le sang défibriné de chien vacciné contre le Staphylocoque, injecté à des lapins, préservait ces derniers contre l'action pathogène de ce germe. Pfeiffer reprit les mêmes expériences avec le Vibrion chlolérique : le sérum de cobayes vaccinés contre le Vibrion de Koch était préventif pour des cobayes neufs.

L'immunité ainsi conférée rentre dans le cadre de l'*immunité passive*.

L'action préventive ne s'exerce pas, comme on a pensé, sur les microbes eux-mêmes, mais, d'après Metchnikoff, sur l'organisme en général. Ce savant a montré qu'elle s'accompagne d'une leucocytose et d'une phagocytose énergique : il l'attribue à une *action stimulante* ou à des substances qu'il a dénommées *stimulines*, contenues dans le sérum des animaux vaccinés, et différentes des agglutinines et des fixateurs.

Ainsi donc, dans l'immunité acquise, comme dans l'immunité naturelle, les phénomènes observés sont superposables à ceux que l'on constate dans la résorption des éléments figurés ; ils sont étroitement liés à la phagocytose.

De nombreuses objections ont été opposées à cette conception : parmi elles, signalons celle de Flügge, qui admettait bien le rôle des phagocytes, mais, selon lui, ils n'englobaient que des microbes morts, *déjà détruits par les humeurs*. Metchnikoff s'attacha à lutter contre cette opinion et démontra que les bactéridies englobées étaient bien vivantes et mêmes virulentes :

Il inocule dans la chambre antérieure de l'œil d'un lapin vacciné de la bactéridie charbonneuse ; il prélève de l'humeur aqueuse et constate que les bactéridies sont phagocytées. Une culture en goutte pendante lui montra qu'elles se développaient ; inoculées à un animal réceptif, elles conféraient le charbon.

Dans le phénomène de Pfeiffer, les granules ensemencés donnent à la culture du Vibrion cholérique. Dans ses expériences montrant

la phagocytose des spirilles de la fièvre récurrente, Metchnikoff a constaté leur mobilité.

Puis les spores du tétanos et du charbon englobées dans les phagocytes restent vivantes pendant des mois entiers, mais sont arrêtées dans leur développement. Il en est ainsi tant que les phagocytes conservent leur intégrité. S'ils souffrent, les spores germent et provoquent l'infection.

Enfin certains germes englobés vivants restent non seulement vivants, mais peuvent y croître et s'y multiplier. C'est le cas de la tuberculose, de la lèpre, etc.

Immunité contre les toxines. — L'immunité contre les toxines peut être naturelle ou acquise.

Immunité naturelle. — On connaît de multiples exemples de résistance naturelle de certains animaux à l'action nocive de produits chimiques comme aussi à l'action du venin des serpents. En matière d'immunité contre les toxines, l'exemple de la résistance de la poule à la toxine tétanique est classique ; elle peut recevoir impunément des quantités énormes de ce poison sous la peau, dans les veines, dans le péritoine.

On a attribué cette résistance à un pouvoir antitétanique naturel de ses humeurs. Or, Vaillard a montré que, mélangés à la toxine tétanique, le sang et le sérum de cet animal ne possédaient aucune propriété neutralisante. Les animaux qui le reçoivent contractent le tétanos comme les témoins.

Cet état réfractaire de la poule peut d'ailleurs être perdu si l'inoculation de toxine est pratiquée dans le cerveau ; en ce cas, elle présente un tétanos typique.

A cet exemple, ajoutons celui du rat, insensible à l'action de la toxine diphtérique et dont le sérum est dépourvu d'antitoxine ; une injection intracérébrale minime le fait succomber rapidement Dans ces faits, si la toxine inoculée sous la peau, dans les veines ou le péritoine, ne peut arriver jusqu'aux centres nerveux, elle doit en être empêchée par une barrière, constituée peut-être par les leucocytes. Ce qui semble le démontrer, c'est le fait suivant :

Chez la poule qui a reçu la toxine tétanique, on peut retrouver cette dernière, notamment dans le sang. En provoquant un exsudat aseptique (avec de la gluten-caséine notamment) dans une cavité séreuse, on remarque que l'exsudat, très riche en leucocytes, est beaucoup plus tétanigène que le sérum. D'ailleurs, l'injection de toxine provoque une hyperleucocytose manifeste (Metchnikoff).

Par cet exemple comme par d'autres encore, Metchnikoff est

enclin à penser que l'immunité naturelle contre les toxines relève encore d'une action leucocytaire.

Immunité acquise. — Des animaux qui ont reçu à plusieurs reprises des doses croissantes de toxine tétanique, diphtérique, etc., sont vaccinés au bout d'un certain temps contre ces toxines. Leur sérum acquiert en général un pouvoir antitoxique considérable ; on a donc attribué à l'antitoxine l'immunité ainsi conférée. Mais cette conception ne peut être généralisée, car le sérum d'animaux vaccinés n'est pas toujours antitoxique.

L'étude de l'immunité acquise contre divers poisons a montré à Metchnikoff et à ses élèves le rôle défensif qu'opéraient les leucocytes en absorbant et transformant ces poisons. En effet :

Calmette injecte dans les veines de lapins 0gr,2 de sulfate d'atropine ; il les saigne et recueille séparément, par centrifugation, le plasma et les globules blancs. Il injecte alors le plasma d'une part, les leucocytes de l'autre, dans le cerveau de lapins neufs : le plasma donne une réaction insignifiante ; les leucocytes, au contraire, provoquent des phénomènes graves pouvant entraîner la mort. Donc l'atropine est arrêtée et absorbée par les leucocytes. Lombard démontre le même fait en injectant le plasma et les leucocytes dans la circulation chez le chat.

Chez les lapins accoutumés à l'arsenic, Besredka injecte du trisulfure d'arsenic dans le péritoine. Au bout d'un certain temps, il se produit une hyperleucocytose abondante, où les macrophages sont bourrés de grains de ce sel insoluble qui finissent par être digérés totalement. En diminuant la réaction phagocytaire par l'injection de grains de carmin, que les leucocytes sont occupés à englober, l'animal présente des troubles graves auxquels il succombe. Avec des sels arsenicaux solubles, il obtient des résultats analogues. D'autre part, l'injection de ces sels dans le cerveau provoque la mort avec une dose cent fois moindre.

Il était permis d'envisager de la même façon le mécanisme cellulaire de l'immunité acquise contre les toxines.

C'est ce que pense Metchnikoff, qui attribue aux phagocytes un rôle de défense accusée non seulement contre les microbes, mais aussi contre les toxines. Pour lui, ce rôle serait dévolu surtout aux macrophages plus qu'aux microphages.

Pour Metchnikoff et son école, *tous les phénomènes d'immunité naturelle ou acquise contre les microbes et les toxines se résument donc dans la phagocytose* ; les phagocytes les englobent et les détruisent. A ce rôle de défense prennent part de nombreuses cellules, les

leucocytes en premier lieu, mais aussi certaines *cellules fixes* de l'économie.

Cette théorie cellulaire de l'immunité a rencontré une forte opposition de la part des savants allemands qui ne voulaient admettre que l'action exclusive des humeurs bactéricides dans la défense de l'organisme contre les bactéries. Mais, depuis quelques années, un nouveau courant d'idées s'est fait jour en Allemagne en faveur de la conception phagocytaire ; il s'est développé à la suite des travaux de Wright, qui a fait intervenir l'action des opsonines dans la production de l'immunité. Pour Wright, les *opsonines* sont des substances solubles contenues dans les sérums normaux et les sérums spécifiques, et ayant pour rôle de préparer les microbes à la digestion leucocytaire, d'exagérer la phagocytose et de la rendre plus efficace. D'après les études récentes, les opsonines des sérums normaux ne seraient autres que l'alexine, issue des leucocytes. L'opsonine des sérums spécifiques, appelée encore *bactériotropine* par Neufeld, ne se distinguerait pas des sensibilisatrices (Levaditi et Inmann).

Wright, par sa théorie, eut donc le mérite de remettre à l'ordre du jour l'étude des propriétés phagocytaires des leucocytes et d'avoir fait accepter par les Allemands l'activité du globule blanc, qu'ils affectaient d'ignorer jusqu'alors.

Bref, *la théorie des opsonines a été le trait d'union entre la théorie phagocytaire et la théorie du pouvoir bactéricide des humeurs.*

THÉORIES PHYSICO-CHIMIQUES.

Théorie des « chaînes latérales » d'Ehrlich.

A la théorie cellulaire, que d'aucuns considéraient comme trop exclusive, Ehrlich, se basant surtout sur la présence, dans les humeurs d'animaux vaccinés, de principes d'ordre vraisemblablement chimique, substitua une théorie moins vitaliste et de nature physico-chimique.

Cette théorie s'appuie en même temps sur la loi de l' « hyperrégénération » et sur l'analogie existant entre l'assimilation des matières nutritives et certains phénomènes observés au cours de l'immunisation.

Pour Ehrlich, la molécule protoplasmique offre certaines analogies avec les groupements de la chimie des corps aromatiques. Comme ces derniers, cette molécule possède un *groupement central*, néces-

saire à la vie et caractéristique du fonctionnement spécifique de la cellule, et des *chaînes latérales*, véritables *récepteurs* vis-à-vis des divers principes en état de dissolution dans les humeurs. En vertu de leurs affinités chimiques et spécifiques, elles attirent certains de ces principes, surtout les principes nutritifs; elles les fixent et permettent à la cellule de se les assimiler. Une substance alimentaire serait ainsi fixée par les chaînes latérales et, après avoir subi les modifications indispensables à son assimilation, serait rejetée par la cellule sans que cette dernière soit altérée.

Il se passe pour les toxines un phénomène analogue. Pour Ehrlich, la molécule de toxine serait constituée par deux groupes : un premier, toxique, *groupe toxophore*; un second, non toxique, *groupe haptophore*, dont une partie serait soudée au groupe toxophore ; l'autre serait libre, mais pourrait se fixer sur les récepteurs ou chaînes latérales de la molécule vivante, pour permettre l'action de la toxine (fig. 15). Si la cellule est saturée par les groupes toxophores, elle est mise hors d'activité ; quand cette saturation s'opère sur un grand nombre d'éléments cellulaires de l'organisme, la mort s'ensuit. Par contre, si la saturation est incomplète, la cellule, pour régénérer les récepteurs devenus inactifs, en forme d'autres, mais elle les régénère en excès, comme certains animaux inférieurs régénèrent en excès les organes locomoteurs qu'ils ont perdus (loi de Weigert).

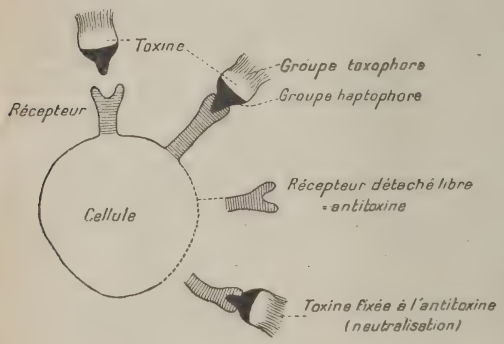

Fig. 15. — Récepteurs de premier ordre.

L'excès étant inutile au fonctionnement de la cellule, cette dernière rejette les récepteurs en excès et les déverse dans le sang et les humeurs de l'organisme. Ces *récepteurs libres* constitueraient les *antitoxines*.

Survienne maintenant une nouvelle dose de toxine, elle rencontrera les récepteurs libres (antitoxines), auxquels les groupes haptophores se fixeront immédiatement. Il en résulte que le groupe

toxophore, lié au groupe haptophore, ne pourra plus rejoindre les cellules sensibles, et l'immunité sera acquise.

Pour expliquer l'immunité naturelle, Ehrlich suppose que la molécule vivante des animaux spontanément réfractaires est dépourvue de récepteurs pour la toxine.

Les bactéries introduites dans l'organisme seraient constituées d'une façon identique par un groupe toxophore et un groupe haptophore ; elles provoquent la formation d'anticorps tels que les *agglutinines*, les *précipitines*, les *bactériolysines*, etc. Comme les antitoxines, et par le même mécanisme, ces anticorps ne seraient que des chaînes latérales ou récepteurs régénérés en excès par la cellule vivante, à la faveur des infections répétées et rendus libres dans les humeurs. Qu'une nouvelle et même infection se produise, les bactéries rencontreront ces récepteurs libres, dont la sensibilisatrice spécifique, se fixeront sur cette dernière, et, grâce à l'alexine contenue dans tout sérum et à son action « complémentaire », la bactériolyse se produira, entraînant la destruction des bactéries en question.

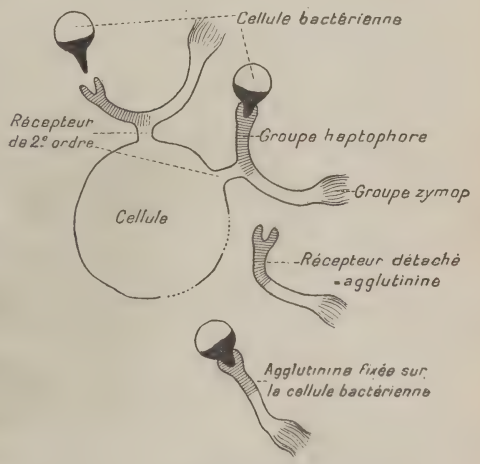

Fig. 16. — Récepteurs de deuxième ordre.

Ehrlich suppose l'existence de plusieurs catégories de récepteurs :

1° *Récepteurs de premier ordre*, servant à la fixation immédiate des toxines ;

2° *Récepteurs de deuxième ordre*, possédant, à côté du groupe haptophore, un groupe zymophore (fig. 16). Les agglutinines appartiennent à cette catégorie de récepteurs. Le groupe haptophore du fixateur fixe le groupe correspondant de la bactérie.

3° *Récepteurs de troisième ordre, ou ambocepteurs, ou sensibilisatrices.* Même constitution que les récepteurs de deuxième ordre, mais au groupe zymophore se substitue un deuxième groupe haptophore :

le premier est le *groupe cytophile* (fig. 17), qui fixe les anticorps sur la cellule; les anticorps exercent leur action avec l'aide de la cytase, alexine, ou complément, qui se fixe sur le deuxième groupe, dit *groupe complémentophile.*

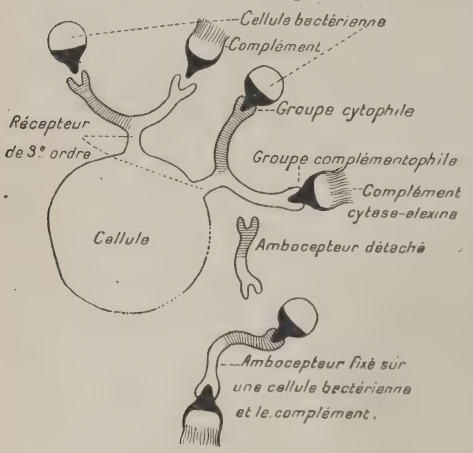

Fig. 17. — Récepteurs de troisième ordre.

Théorie de M. Nicolle.

Pour M. Nicolle, les phénomènes d'immunité s'expliquent de la façon suivante :

L'immunité représente une propriété de l'organisme en vertu de laquelle tout corps qui y est introduit (microbe, toxine, albumine, cellule quelconque), et pouvant recevoir la dénomination d'*antigène*, y est détruit par l'action de nouveaux corps engendrés par la réaction que cet antigène provoque : ce sont les *anticorps.*

Ces anticorps sont constitués d'une façon générale, qu'il s'agisse d'une cellule, d'une toxine, etc., par : les *coagulines*, auxquelles est dévolu le rôle de coaguler l'antigène, et les *lysines*, qui se chargent de les détruire et de les dissoudre.

M. Nicolle comprend, sous le vocable de coagulines, les *agglutinines* et les *précipitines* qui agissent sans avoir besoin de recourir à l'action du complément. Les lysines sont représentées par les *cytolysines*, les *bactériolysines.*

Grâce à ces anticorps, les antigènes subissent dans l'organisme immunisé des transformations, qui se ramènent aux modifications qu'apportent les ferments digestifs pour amener la digestion complète. Ils sont tout d'abord coagulés, puis lysés. Et cette transformation s'opère, soit en dehors des cellules, soit dans les cellules qui jouissent du pouvoir de les fixer et de les englober.

CHAPITRE IV

PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES SUJETS IMMUNISÉS

Quand on étudie au point de vue biologique le sérum de sujets immunisés, soit par infection spontanée, soit par infection expérimentale, on met en évidence diverses propriétés dont plusieurs ont été appliquées à la pratique bactériologique.

POUVOIR AGGLUTINANT. — AGGLUTINATION.

Le sérum d'un être vivant ayant reçu un antigène quelconque (cellule ou bactérie) présente, au bout de quelque temps, le pouvoir d'agglutiner *in vitro* ce même antigène. Prenons un exemple concret :

Dans un tube à essai, versons une dilution légère de sang défibriné de mouton, et du sérum chauffé de lapin ayant reçu plusieurs injections de ce même sang.

Dans un tube témoin, versons les mêmes hématies et du sérum normal ; au bout de quelques minutes, voici ce qu'on observe :

Dans le tube témoin, le mélange reste homogène ; dans le tube qui contient l'antisérum, le mélange devient grumeleux, et l'on voit les hématies se déposer au fond du tube, le liquide surnageant restant clair. Au microscope, les grumeaux sont constitués par des amas d'hématies, *agglutinées* intimement les unes aux autres,

Il en est de même pour les sérums d'animaux traités par des bactéries. Mélangeons comme précédemment du sérum d'animal inoculé à plusieurs reprises avec du bacille typhique et une émulsion de ce même germe : dans le tube témoin, le trouble reste homogène; dans l'autre, les bactéries s'agglutinent en amas, qui tombent au fond du tube. Quand on suit le phénomène au microscope, on remarque tout d'abord que les bacilles typhiques perdent leur mobilité, puis ils s'agglutinent les uns aux autres, pour former des amas d'autant plus considérables que le pouvoir agglutinant du sérum est plus élevé.

Ce phénomène a été observé pour la première fois par Bordet, en

étudiant *in vitro* l'action du sérum anticholérique sur le Vibrion de Koch, additionné d'exsudat péritonéal de cobaye. En réalisant ainsi un phénomène de Pfeiffer, il vit d'abord que les Vibrions s'agglutinaient avant de se transformer en granules.

Plus tard, Gruber et Durham étudient à ce point de vue divers antisérums, et montrent, par le pouvoir agglutinant que chacun possède sur les germes correspondants, la possibilité de différencier les Vibrions cholériques vrais des Vibrions voisins, et le Bacille typhique et les Bacilles éberthiformes.

C'est assurément Widal et Sicard qui ont le mieux fait connaître le phénomène de l'agglutination. Ils ont observé sa production en mettant en présence le sérum de malades atteints de fièvre typhoïde et des cultures de Bacille typhique. On sait le parti qu'ils ont tiré de cette réaction pour établir le séro-diagnostic de la fièvre typhoïde.

Depuis lors, on a étendu ces recherches à tous les microbes pathogènes connus et, pour la plupart d'entre eux, la réaction agglutinante est couramment effectuée soit pour diagnostiquer un état infectieux déterminé, soit pour identifier un germe dont la nature paraît suspecte.

En dehors des exemples précédents, citons l'agglutination des Bacilles paratyphiques, du Bacille dysentérique, du Méningocoque, des spores de *Sporotrichum Beurmanni*, du bacille pesteux, du *M. melitensis*, etc.

Ce pouvoir agglutinant serait dû à la production, dans le sérum des sujets infectés ou vaccinés, d'une substance spéciale dénommée *agglutinine*. On a reconnu toutefois, dans les sérums immuns, l'existence de plusieurs sortes d'agglutinines, les unes *spécifiques*, d'autres *non spécifiques* ou *coagglutinines* ; enfin des *sérums normaux* peuvent, dans certaines conditions, être agglutinants.

Agglutinines spécifiques. — Les agglutinines *spécifiques* sont celles qui, prenant naissance dans le sérum des organismes infectés, exercent leur action uniquement sur la bactérie infectante, respectant ainsi les bactéries étrangères. Leur production est liée non pas à l'immunité, comme on l'a supposé, mais à l'infection. Widal et Sicard l'ont bien démontré en faisant ressortir qu'un typhoïdique, dont le sérum est très agglutinant, peut néanmoins présenter une rechute ou une récidive. La réaction agglutinante *n'est pas une réaction d'immunité, mais une réaction d'infection*.

Mode d'obtention. — On obtient facilement la production d'agglutinines spécifiques en injectant à un animal des doses croissantes d'une *culture microbienne vivante* ; elles peuvent apparaître à la

suite des injections, sous-cutanées, intrapéritonéales, intraveineuses. La voie intraveineuse est préférable à toute autre. Le pouvoir agglutinant du sérum n'apparaît en général qu'une dizaine de jours après la première injection ; il augmente au fur et à mesure des inoculations pratiquées ; mais, comme pour les autres anticorps, sitôt après les injections, il baisse rapidement pour se montrer à nouveau dans les jours qui suivent.

Les agglutinines peuvent encore s'obtenir par inoculation à l'animal de microbes morts (tués par la chaleur, le chloroforme, l'éther, le formol, les rayons ultra-violets) en milieu liquide ou desséché.

Elles apparaissent aussi après les injections de certaines toxines, surtout de toxines obtenues par autolyse ou macération de corps microbiens. Toutefois le pouvoir agglutinant est plus régulièrement obtenu après injection de microbes. Ainsi le sérum antidiphtérique préparé avec des cultures est infiniment plus agglutinant que s'il est préparé avec la toxine (L. Martin).

Caractères généraux. — Les agglutinines se rapprochent assez étroitement des diastases et des colloïdes. En général, à part quelques exceptions (sérum antidysentérique, sérum antiméningococcique), elles sont *thermostabiles* ; elles ne sont détruites qu'à 70°, elles résistent au chauffage à 55°.

Elles manifestent leur action plus énergiquement à la température de 37° qu'à la température du laboratoire ; pour certains germes, la température optima pour l'agglutination est 55° ; il en est ainsi pour le bacille typhique, le méningocoque (Kutscher).

Les agglutinines résistent à la dessiccation, à la putréfaction.

Solubles dans l'eau et précipitables par l'alcool, elles ne traversent presque pas les filtres et les membranes dialysantes.

Dans l'organisme vivant, elles se montrent non seulement dans le sang, mais dans certaines humeurs, notamment le lait, l'humeur aqueuse, la partie liquide du pus, parfois l'urine, les sérosités pleurale et péricardique, les larmes. Par contre, elles ne passent pas dans la salive, le liquide céphalo-rachidien normal.

Les agglutinines spécifiques traversent le filtre placentaire et passent de la mère au fœtus.

Dans l'organisme infecté, le pouvoir agglutinant du sérum commence à se montrer en général vers la fin du premier septénaire ou au début du second. Il persiste pendant toute la durée de la maladie et peut lui survivre durant un temps variant de quelques mois à plusieurs années, suivant les cas et suivant les infections. Elles permettent parfois ainsi un diagnostic rétrospectif.

Origine. — On est encore mal renseigné sur l'origine des agglu-

tinines spécifiques. Pour Bordet, elles reconnaîtraient une origine leucocytaire, et cependant des leucocytes séparés du plasma par centrifugation en paraissent presque complètement dépourvus.

Kraus et Schiffmann pensent qu'elles proviennent de l'endothélium vasculaire; Pfeiffer et Dieudonné de la rate.

Mécanisme de l'agglutination. — Le mécanisme de l'agglutination a été et est toujours très discuté :

Grüber pensait que, sous l'influence du sérum agglutinant, la couche superficielle des bactéries se gonflait, devenait visqueuse, ce qui permettait l'adhérence avec les microbes voisins. En réalité, nul n'a pu constater au microscope l'existence de cette tuméfaction.

Rappelons pour mémoire l'hypothèse inadmissible de Danner, d'après qui l'agglutination serait due à l'enchevêtrement des cils. Or de nombreux microbes sont agglutinables et sont cependant dépourvus de cils vibratiles.

Pour Kraus, la substance agglutinable n'est pas contenue dans le corps microbien. En ajoutant, en effet, un antisérum à une culture filtrée de microbes correspondants, on observe un précipité floconneux, comme si l'on avait fait agir le sérum sur une culture non filtrée. Par conséquent, la substance agglutinable existerait dans le liquide de la culture. Cette expérience est tout à fait analogue à celle que l'on pratique pour obtenir les précipitines (p. 67); or, on discute encore actuellement pour savoir si les précipitines doivent ou non être confondues avec les agglutinines.

Agglutinines non spécifiques. — A côté des agglutinines spécifiques, n'exerçant leur action que sur les cellules ou bactéries ayant infecté l'organisme, il y a place pour des agglutinines dépourvues de spécificité.

Agglutinines des sérums normaux. — Certains sérums normaux, en effet, sont naturellement agglutinants pour certaines bactéries. Le fait se présente surtout pour le sérum de cheval, qui peut agglutiner, en de faibles proportions il est vrai, le Colibacille, le Bacille tétanique, le *Vibrio Metchnikowi*, parfois le Bacille typhique, le Bacille dysentérique des types Flexner et Hiss.

Le sérum humain est parfois agglutinant à 1/10, 1/20 pour le bacille d'Eberth; il l'est souvent pour le Colibacille, ou plutôt certains échantillons de Colibacille, même à 1/300, pour le Bacille de Flexner à 1/50 et même 1/60, pour le *M. melitensis*.

Enfin plusieurs auteurs ont pu constater des agglutinations, en additionnant les cultures de diverses substances chimiques : sublimé à 0,07 p. 1 000, formol, alcool, solutions de vésuvine, safranine à

1 p. 1 000, acide lactique, acide acétique, eau oxygénée, sulfate d'ammoniaque. Malvoz a ainsi provoqué des agglutinations nettes pour le bacille typhique ; de même Blachstens pour le Vibrion cholérique avec la chrysoïdine. Il est bien évident que les agglutinations ainsi obtenues ne peuvent revêtir aucun caractère de spécificité.

Agglutinines de groupe ou coagglutinines. — Le sérum d'un animal vacciné contre un microbe donné contient parfois, outre l'agglutinine spécifique correspondant à ce dernier, des agglutinines exerçant leur action sur des germes voisins du premier. C'est pour cette raison qu'on leur a donné le nom d'*agglutinines de groupe*, ou *coagglutinines*, ou encore *hétéro-agglutinines*.

Citons quelques exemples : le sérum anticholérique agglutine spécifiquement le Vibrion cholérique, mais il peut agglutiner aussi les Vibrions voisins du Vibrion de Koch. Il en est de même du sérum antityphique et des germes voisins du Bacille typhique : colibacilles, éberthiformes, voire même des paratyphiques.

Le sérum antiméningococcique contient des agglutinines spécifiques pour le méningocoque, mais aussi parfois des coagglutinines pour les germes similaires et même le gonocoque.

En général, c'est le sérum de cheval qui est le plus riche en coagglutinines : le sérum de lapin en est à peu près dépourvu.

Ces agglutinines de groupe se retrouvent encore parfois, mais plus rarement, dans les *sérums humains* ; le sérum des typhiques agglutine parfois, outre le Bacille d'Eberth, les Bacilles paratyphiques, le Colibacille, etc. Nègre et Raynaud ont fait récemment connaître des coagglutinations du *M. melitensis* avec le sérum de sujets atteints d'une affection étrangère à la fièvre de Malte.

Un bel exemple de faits identiques a été fourni par Widal, Abrami, Joltrain et Brissaud en étudiant le sérum de sporotrichosique et son action sur divers champignons pathogènes de l'homme. Ce sérum agglutine les spores de *Sporotrichum*, mais il possède aussi des coagglutinines pour divers *Oospora*, l'*Endomyces albicans*, des *Oïdium*, des *Tricophyton*. De même le sérum des actinomycosiques coagglutine les spores du *Sporotrichum*.

Caractères. — On connaît assez mal les caractères de ces coagglutinines. On sait cependant qu'elles sont en général beaucoup moins abondantes dans un immunsérum que les agglutinines spécifiques. Pour prendre l'exemple du sérum anticholérique : si ce dernier agglutine le Vibrion cholérique à 1 p. 4000 par exemple, la coagglutination de Vibrions similaires ne s'effectuera qu'à des taux beaucoup plus minimes ; 1 p. 100, 1 p. 300.

Nègre et Raynaud ont montré que le chauffage à 55° pendant cinquante minutes faisait perdre à certains sérums leur pouvoir coagglutinant vis-à-vis du *M. melitensis*, ces sérums conservant toujours leur pouvoir agglutinant spécifique. Cette propriété ne peut s'étendre à toutes les coagglutinines, car le chauffage reste sans influence sur celles que contiennent parfois les sérums antityphique, antichoiérique, etc.

Applications pratiques. — ***Technique de l'agglutination.*** — Divers procédés sont employés, suivant les microbes, pour la recherche de l'agglutination et la constatation des amas qui la caractérisent.

Procédé extemporané, microscopique. — C'est celui que Widal a fait connaître pour la recherche de l'agglutination du Bacille typhique par le sérum des typhoïdiques :

Dans un verre de montre, on verse, par exemple, XL gouttes de culture de bouillon âgée de vingt-quatre heures, ou d'une émulsion d'une culture de même âge en gélose raclée dans l'eau physiologique. On y ajoute I goutte du sérum à l'étude. On mélange bien pour obtenir une dilution homogène.

On prélève ensuite une goutte de ce mélange : on la dépose entre lame et lamelle, et on observe avec un objectif à sec. Alors que dans la culture témoin, sans addition de sérum, les bacilles restent isolés et mobiles, au contraire, dans le mélange culture-sérum, les bacilles perdent d'abord leur mobilité, puis s'agglutinent entre eux : on perçoit en effet des amas microbiens plus ou moins volumineux.

Il faut avoir soin de vérifier au microscope si la culture employée est bien homogène et ne présente pas de faux amas. S'il en existe, il suffit de filtrer grossièrement la culture sur un filtre de papier qui retient ces amas.

Pour que l'agglutination puisse être déclarée positive, il faut que le microscope fasse découvrir des amas bien formés, avec peu ou pas de bacilles mobiles libres dans l'intervalle.

Procédés macroscopiques. — On peut réaliser l'agglutination macroscopique de différentes façons :

I. — Dans deux tubes de bouillon, on ensemence du bacille typhique, et, dans l'un d'eux, on ajoute une ou plusieurs gouttes d'antisérum. On porte à l'étuve à 37° ; après seize à vingt heures, on observe ; dans le tube contenant la culture seule, celle-ci a poussé en formant le trouble homogène classique ; dans celui qui a reçu du sérum, le milieu est clair, mais le fond est envahi par des amas microbiens ; les bacilles typhiques, en effet, au fur et à mesure de leur multiplication, se sont agglutinés.

C'est ce procédé qu'ont employé Bezançon et Griffon pour la recherche de l'agglutination avec le sérum des sujets atteints d'affections pneumococciques.

II. — On mélange dans des tubes étroits 1 centimètre cube d'une dilution donnée de sérum anticholérique et une émulsion de Vibrions cholériques. On laisse à la température du laboratoire, ou on porte à l'étuve à

37°: dans les tubes témoins ne contenant que l'émulsion microbienne, le liquide reste trouble, sans dépôt ; dans le tube en expérience, le liquide devient clair, et les amas tombent au fond.

On effectue une technique semblable pour le méningocoque et le sérum antiméningococcique, Mais ici, pour apprécier l'agglutination, il est indispensable d'agiter légèrement le tube ; on voit nettement les grumeaux qui se sont formés.

Dans toutes ces expériences, il est indispensable d'utiliser deux tubes témoins, l'un ne contenant que l'émulsion microbienne, l'autre contenant la même émulsion additionnée de sérum normal.

Mensuration du taux agglutinatif d'un sérum. — Les épreuves d'agglutination en vue des séro-diagnostics exigent la mensuration du taux agglutinatif. Ce dernier est important à connaître pour essayer, à première vue, de différencier une agglutinine spécifique d'une coagglutinine. On sait en effet que l'agglutination de groupe s'exerce à un taux plus minime que l'agglutination spécifique.

Dans ce but, il faut utiliser les dilutions successives :

Avec le *procédé microscopique*, rien n'est plus simple : dans plusieurs verres de montre on verse respectivement 19, 29, 49, 79, 99 gouttes de culture, et on y ajoute une goutte égale du sérum, ce qui donne des dilutions à 1/20, 1/30, 1/50, 1/80, 1/100 et au-delà. Pour éviter de compter un aussi grand nombre de gouttes, on peut diluer le sérum avec de l'eau physiologique et employer le nombre de gouttes de cette dilution et de la culture pour obtenir les taux désirés. On observe alors l'agglutination au microscope comme précédemment, et l'agglutination est dite positive à 1/100, 1/200, etc., quand à ce taux correspondent les limites de l'agglutinabilité.

Il faut avoir soin d'utiliser des gouttes de volume rigoureusement identique de sérum et de culture. Pour cela, il faut se servir de pipettes de calibre bien égal. Widal conseille d'étirer à la flamme un tube de verre, de casser par le milieu la partie étirée : les deux pipettes qui résultent de cette opération sont égales.

Avec le *procédé macroscopique*, on prépare des dilutions successives de sérum à 1/100, 1/200, 1/300,... 1/1000, etc. On en verse dans chaque tube 1 centimètre cube ; on y ajoute une même quantité d'émulsion. Il est facile de voir au bout d'un certain temps, par la formation des amas et la clarification du liquide, à quel taux s'arrête l'agglutination.

Détermination de la nature spécifique ou non des agglutinines. — On peut reconnaître la nature d'une agglutinine, douée ou non de spécificité, par l'*épreuve de Castellani*, dite encore épreuve de *saturation* ou d'*absorption des agglutinines*.

Soit l'exemple d'un sérum qui agglutine à la fois et à un taux sensiblement égal le Bacille d'Eberth et un Bacille paratyphique. On en verse 4 à 5 centimètres cubes dans deux tubes A et B. Dans le tube A, on émulsionne trois à quatre fois de suite, à intervalles de trente minutes

au moins, le produit de raclage d'une culture de Bacille d'Eberth sur gélose; dans le tube B, on opère de même avec le Bacille paratyphique envisagé. Après le dernier passage, on centrifuge, on décante le sérum devenu clair.

L'agglutination est recherchée à nouveau sur les deux microbes avec les deux sérums décantés.

Supposons que le sérum décanté du tube B reste inactif sur le Bacille paratyphique et agglutine encore le Bacille typhique, et que le sérum du tube A soit inactif sur les deux germes. Voici ce qui s'est passé :

Le bacille typhique a fixé toutes les agglutinines et « saturé » le pouvoir agglutinant du sérum à l'égard des deux microbes, bacille typhique et bacille paratyphique : au contraire, le bacille paratyphique a fixé seulement les agglutinines qui agissaient sur lui, mais il n'a pas modifié le pouvoir agglutinant du sérum à l'égard du bacille typhique.

Conclusion : le bacille infectant est le bacille typhique. L'action du sérum sur le bacille paratyphique relève de la coagglutination.

On observe des résultats identiques dans les autres exemples de coagglutination.

Les applications pratiques du séro-diagnostic, basé sur cette propriété agglutinante des immun-sérums, seront traitées à propos de l'étude particulière des microbes.

POUVOIR PRÉCIPITANT. — PRÉCIPITATION.

Prenons une culture en bouillon de bacille typhique; filtrons-la sur bougie Chamberland; versons 2 à 3 centimètres cubes du filtrat dans deux tubes à essai; à l'un d'eux ajoutons une à plusieurs gouttes de sérum antityphique, à l'autre une même quantité de sérum normal.

Voici le phénomène qui se produit immédiatement :

Dans le tube contenant le filtrat et le sérum antityphique, un trouble prend naissance; si l'expérience se prolonge, des flocons apparaissent, sorte de précipité qui tombe petit à petit au fond du tube, le liquide surnageant devenant clair et limpide.

Dans le tube contenant le filtrat et le sérum normal, il ne se produit aucun trouble : pas de précipitation. Telle est la réaction type des précipitines, dite *réaction de Kraus*.

Elle peut s'obtenir avec tous les microbes connus mis en présence de leur antisérum; l'expérience en a été faite surtout avec les cultures filtrées de Vibrion cholérique, de Bacille pesteux; on suppose que cette précipitation est due à la présence de substances spéciales contenues dans les antisérums; on les a nommées des *précipitines*. Dopter a constaté leur existence dans le sérum des animaux vaccinés contre le Bacille dysentérique, le Méningocoque, le Gonocoque, etc.

Bonome a tenté d'utiliser cette réaction pour distinguer les bacilles

tuberculeux d'origine humaine et bovine : il fait agir le sérum des malades sur des extraits microbiens ou des extraits d'organes tuberculeux. Bezançon et de Serbonne n'ont pu confirmer ces résultats.

Ces précipitines ne sont pas spéciales aux sérums d'animaux vaccinés contre les bactéries ; elles prennent encore naissance quand l'animal a été immunisé contre les toxines ; enfin on les observe aussi dans le sérum des animaux traités par le sang, l'albumine, le sperme et diverses humeurs de l'organisme.

Ainsi le sérum d'un lapin qui a reçu dans le péritoine du sang humain défibriné, mis en présence *in vitro* de sérum humain, est précipitant pour ce dernier.

Uhlenhuth a tiré parti de la spécificité relative de cette réaction pour l'appliquer à certaines catégories de recherches médico-légales, destinées à déceler l'origine du sang provenant de taches découvertes sur un linge, d'albumines diverses, d'origine humaine ou animale.

Elle a été appliquée aussi au diagnostic de l'échinococcose, le sérum de malades atteints de kyste hydatique étant souvent précipitant pour le liquide hydatique.

Caractères généraux. — On connaît peu les caractères généraux des précipitines ; elles ont été en effet moins étudiées que les agglutinines.

L'action précipitante des sérums semble se manifester mieux à 38° qu'à la température du laboratoire ; on discute encore pour savoir à quelle température elle ne se manifeste plus : les avis ne sont pas concordants. Les uns fixent 58° comme température limite, d'autres 70°.

D'après les auteurs, les précipitines ne seraient douées que d'une spécificité relative. En effet : quand on inocule à un animal le sang d'une espèce différente, son sérum précipite celui de cette espèce, mais aussi quelque peu celui des espèces très voisines. Ainsi, on prépare un mouton avec du sérum de lapin ; le sérum de ce mouton précipite fortement le sérum de lapin, mais aussi, quoique d'une façon moins intense, le sérum de cobaye.

Il en est de même pour les bactério-précipitines. Ainsi le sérum antiméningococcique précipite avec intensité l'extrait autolytique de méningocoque, mais aussi, bien que moins fortement, l'extrait des germes similaires : *D. crassus*, *D. pharyngis*, *Flavus*, *M. catarrhalis*, le Gonocoque.

On en a conclu que la spécificité de ces précipitines n'était pas absolue. Dopter a montré cependant que les précipitines se comportaient à cet égard comme les agglutinines, et qu'il existait des *précipitines spécifiques* et des *précipitines de groupe* ou *co-précipitines*.

L'épreuve de l'absorption des précipitines le prouve : le sérum antiméningococcique mélangé à un extrait de pseudo-méningocoques conserve son pouvoir précipitant pour un extrait de Méningocoques; mélangé à un extrait de Méningocoques, il le perd pour un même extrait neuf.

Rapports entre les agglutinines et les précipitines. — La plupart des auteurs ont été frappés de la similitude de production et d'action des agglutinines et des précipitines. Des études comparatives qui ont été faites, les uns ont conclu à l'identité de ces substances, d'autres à leur nature différente. Un sérum agglutinant est en général précipitant, mais un sérum précipitant n'est pas toujours fatalement agglutinant. D'autre part, on sait (V. Bail) qu'un sérum précipitant, après avoir exercé son action sur un extrait microbien, est encore agglutinant au même taux qu'avant l'expérience. Mais, par contre, un sérum ayant servi à l'absorption des agglutinines et ayant perdu ces dernières n'est plus précipitant pour l'extrait du même germe.

Devant des faits aussi contradictoires, il est assez difficile de conclure.

BACTÉRIOLYSE.

L'expérience classique du *phénomène de Pfeiffer* (Voy. p. 553) est assurément celle qui met le mieux en évidence le pouvoir bactériolytique du sérum d'un animal vacciné. C'est d'ailleurs elle qui fut le point de départ de toutes les recherches et des découvertes qui furent faites à ce sujet.

La transformation des Vibrions cholériques en granules chez les animaux vaccinés, l'absence de cette transformation chez les cobayes témoins prouvent d'une façon manifeste l'existence des propriétés bactériolytiques de l'antisérum, en même temps que leur caractère spécifique.

Il en est de même de la dissolution du Méningocoque introduit dans le péritoine d'un cobaye qui a reçu préalablement par la même voie du sérum antiméningococcique.

Il s'agit maintenant de pénétrer le mécanisme de cette bactériolyse.

Mécanisme de la bactériolyse. — Les travaux de Metchnikoff et de Bordet ont permis de comprendre comment et à quelles conditions s'effectue la bactériolyse.

Rappelons l'expérience de Bordet : dans un tube on verse une légère émulsion de Vibrions cholériques, puis un dixième de sérum frais de cobaye vacciné contre ce germe. Après deux heures de

séjour à l'étuve à 37°, examiner une goutte de ce mélange; les Vibrions ont subi la bactériolyse (transformation en granules).

Au lieu de sérum frais de cobaye vacciné, employons le même sérum *chauffé* à 55° au bain-marie pendant trente minutes; ajoutons-le à une même émulsion de Vibrions cholériques; la transformation en granules ne se produit pas.

Dans cette dernière expérience, le sérum semble avoir perdu toute activité bactériolytique. Il n'en est rien cependant, car à ce mélange culture-sérum chauffé il suffit d'ajouter une goutte de sérum frais de cobaye neuf pour voir la bactériolyse s'effectuer; d'après l'expression consacrée, le sérum chauffé a été ainsi *réactivé*.

Avec Metchnikoff, Bordet en déduisit que le pouvoir bactéricide ou bactériolytique du sérum d'un animal immunisé est dû à l'*action combinée* de deux substances ayant des propriétés différentes.

L'une, contenue dans tout sérum, même normal, *thermolabile*, disparaissant par le chauffage à 55° pendant une demi-heure. C'est l'ALEXINE (Buchner), ou CYTASE (Metchnikoff), ou COMPLÉMENT (Ehrlich).

L'autre, qui n'existe dans le sérum que chez les sujets immunisés, *thermostabile*, résistant au chauffage à 55° pendant une demi-heure. Elle possède la propriété de *sensibiliser* les microbes ayant servi à la vaccination, c'est-à-dire de les rendre sensibles à l'action destructive de l'alexine. C'est la SENSIBILISATRICE (Bordet), ou le FIXATEUR (Metchnikoff) ou l'AMBOCEPTEUR (Ehrlich).

Les microbes sensibilisés conservent fixés à eux-mêmes cette sensibilisatrice, car, si on les débarrasse par lavages successifs du sérum sensibilisateur liquide où ils sont en suspension, ils conservent la propriété d'être détruits si on les met en contact avec l'alexine.

En un mot, cette sensibilisatrice se combine à la fois avec le microbe ayant servi à l'immunisation et avec l'alexine que l'on trouve dans tout sérum. D'après l'expression de Bordet, elle joue le rôle de véritable *mordant*, rendant un tissu apte à subir l'action des matières colorantes.

Enfin cette sensibilisatrice ainsi développée est spécifique, c'est-à-dire qu'elle ne se fixe que sur les germes qui lui correspondent. Mais, comme les autres anticorps (agglutinines, précipitines), la sensibilisatrice ne paraît pas toujours douée d'une spécificité absolue. Widal et ses élèves ont fait connaître des phénomènes de co-sensibilisation dans certaines affections mycosiques : le sérum de sporotrichose sensibilise une culture de *Sporotrichum*, mais co-sensibilise auss des cultures d'actinomycose et de muguet, et inversement. Un sérum antiméningococcique anti-Aco-sensibilise les méningocoques B, C et D (Dopter). Il existe donc, à côté des sensibilisatrices

spécifiques, des *co-sensibilisatrices* ou *sensibilisatrices de groupe*.

Mise en évidence de la sensibilisatrice par la réaction de fixation du complément. — Bordet avait mis en évidence l'action de la sensibilisatrice par la transformation du Vibrion cholérique en granules. Mais tous les microbes ne sont pas aussi fragiles que le Vibrion cholérique et ne subissent pas ces métamorphoses facilement constatables au microscope. Il fallait donc, pour ces derniers, employer un procédé différent. C'est ce qu'ont fait Bordet et Gengou avec l'épreuve de la *fixation du complément* improprement appelée *déviation du complément*, car c'est bien une fixation et non une déviation qui se produit).

Notions fondamentales. — Pour bien saisir cette réaction, où entrent des phénomènes de bactériolyse et d'hémolyse, il faut se rappeler les notions fondamentales suivantes :

1° L'hémolyse par le sérum des animaux préparés par injection de sang défibriné d'espèces étrangères s'effectue dans des conditions identiques à celles de la bactériolyse et suivant un mode semblable.

Soit un lapin ayant reçu dans le péritoine plusieurs injections de sang défibriné de mouton : son sérum *frais*, mis en contact avec des hématies de mouton, lavées, les dissout *in vitro* et produit ainsi l'hémolyse.

Répétons l'expérience avec le même sérum chauffé à 55° pendant une demi-heure : la dissolution des hématies ne se produit pas. L'hémolyse est nulle. Mais réactivons le mélange à l'aide d'une ou plusieurs gouttes de sérum frais d'un animal normal, l'hémolyse s'effectuera.

Par conséquent, comme la bactériolyse, sur laquelle l'hémolyse et la cytolyse en général sont calquées, l'hémolyse est due à l'existence dans le sérum du lapin « préparé » d'une sensibilisatrice spécifique, qui, se fixant sur les hématies de mouton, les rend sensibles et aptes à subir l'action destructive de l'alexine que le sérum contient normalement. C'est, ici encore, à l'action combinée des deux substances que l'hémolyse doit sa production. Cette sensibilisatrice est spécifique et n'exerce son action, en principe, que sur les hématies de l'espèce animale qui a servi à la préparation du sérum.

2° La bactériolyse et l'hémolyse demandent, pour s'effectuer, des *sensibilisatrices différentes*; mais une seule et même *alexine* avec laquelle ces substances se combinent est suffisante pour provoquer la destruction des bactéries et des hématies.

Ces notions vont nous permettre de comprendre le mécanisme de la réaction de fixation :

Dans un tube à essai (fig. 18), on verse : 1° du sérum antidysentérique chauffé à 55° pendant trente minutes; 2° une émulsion de ba-

cilles dysentériques : 3° quelques gouttes d'alexine (premier temps).

Abandonnons le mélange pendant cinq heures à la température

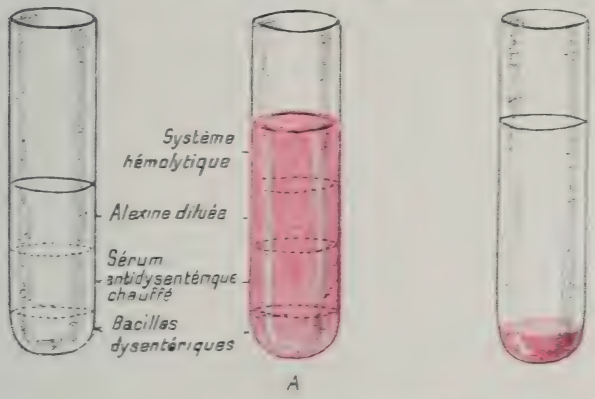

Fig. 18. — Expérience avec un sérum spécifique.

Tube de gauche : premier temps de la réaction. Tubes A et B : deuxième temps. — A, aussitôt après le mélange de toutes les substances. B, réaction terminée : pas d'hémolyse.

du laboratoire ou une heure à l'étuve à 37°; pendant ce temps,

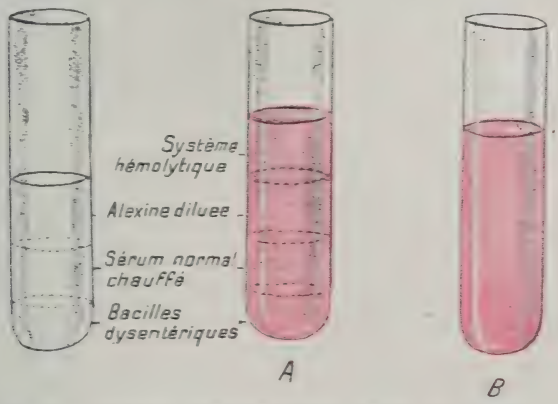

Fig. 19. — Expérience témoin avec sérum normal ou non spécifique.

Tube de gauche : premier temps de la réaction. Tubes A et B : deuxième temps. — A, aussitôt après le mélange de toutes les substances : B, réaction terminée : hémolyse.

l'antigène (bacille dysentérique) sensibilisé par l'antiserum correspondant absorbe l'alexine.

Dans un deuxième temps, ajoutons le système hémolytique (glo-

bules rouges de mouton et sérum de lapin anti-mouton); les hématies sensibilisées par le sérum hémolytique s'agglutineront et se déposeront au fond du tube, mais ne seront pas dissoutes; l'hémolyse ne se produit pas. En effet, pour que l'hémolyse prenne naissance, l'alexine est nécessaire; or, celle-ci, absorbée par les microbes sensibilisés, est fixée sur ces derniers et n'existe plus à l'état libre dans la masse liquide. L'absence d'hémolyse constitue donc le témoin indiscutable de la *fixation du complément* par les bactéries mises en présence de leur sérum spécifique.

Répétons la même expérience en mettant en contact les Bacilles dysentériques avec un sérum ne contenant pas de sensibilisatrice dysentérique, du sérum antistreptococcique par exemple; les microbes n'ayant pas subi l'influence sensibilisante de ce sérum de spécificité différente ne fixent pas l'alexine; celle-ci reste donc libre. Ajoutons le système hémolytique : les hématies sensibilisées, rencontrant le complément à l'état de liberté, le fixent, se dissolvent, et l'hémolyse se produit (fig. 19). L'hémolyse, dans le cas particulier, est donc un témoin infaillible de la *non-fixation du complément* par les bactéries mises en présence d'un sérum de spécificité étrangère.

Technique de la réaction de fixation de Bordet-Gengou. — Nous indiquerons tout d'abord la préparation du matériel d'étude qu'il faut utiliser, puis le dispositif de l'expérience.

Préparation du matériel. — Sérum a l'étude. — On est en possession du sérum dans lequel on se propose de rechercher la sensibilisatrice : sérum d'animal vacciné, ou sérum de malade. On le chauffe au bain-marie à 55° pendant trente minutes pour le dépouiller de son alexine propre.

Ce chauffage, on l'a vu plus haut, laisse intacte la sensibilisatrice que l'on veut mettre en évidence.

Hématies de mouton. — Le sang est recueilli, par ponction de la veine jugulaire d'un mouton, dans un ballon stérile contenant des perles de verre pour le défibriner par agitation. On le défibrine, puis on le centrifuge. La centrifugation terminée, décanter le liquide surnageant par aspiration dans une pipette : le remplacer par de l'eau physiologique stérile. Centrifuger et laver ainsi trois fois. Après la dernière centrifugation, émulsionner les hématies dans un volume d'eau physiologique tel que le volume de la masse soit égal au volume primitif du sang total employé.

Sérum hémolytique. — On prépare le sérum hémolytique en injectant dans le péritoine d'un lapin, par exemple, 6 à 8 centimètres cubes de sang de mouton défibriné; on répète ces injections trois fois à huit jours d'intervalle. Huit à dix jours après la dernière injection, on prélève le sang du lapin par ponction de la veine marginale de l'oreille, ou de la jugulaire, ou de la carotide. Après coagulation, on décante le sérum obtenu; on le chauffe à 55° pendant une demi-heure pour le priver de son alexine propre.

Alexine ou complément. — L'alexine, ou complément, sera représentée par le sérum d'animal neuf fraîchement recueilli et non chauffé. On utilise de

préférence le sérum de *cobaye*, dont l'alexine présente moins de variations que celle du sérum des autres animaux. Le pouvoir alexique de ce sérum, très élevé dès la coagulation, diminue d'intensité dans les jours qui suivent, mais son activité devient plus stable. Nicolle conseille d'employer le sérum huit à dix jours après la saignée. On le titre avant de l'utiliser.

Antigène. — L'antigène varie suivant la recherche à laquelle on se livre ; il est souvent constitué par des *microbes*. On les prépare de la façon suivante : on émulsionne une culture sur gélose inclinée âgée de vingt-quatre heures dans 2 centimètres cubes d'eau physiologique, et on en utilise la quantité que le titrage de l'antigène a déterminée comme optima.

En d'autres cas, au lieu d'émulsion microbienne, on emploie l'extrait autolytique d'une culture ; on émulsionne une culture en boîte de Roux âgée de vingt-quatre heures dans 10 centimètres cubes d'eau *distillée*. On abandonne le produit, qu'on laisse macérer à la température du laboratoire pendant vingt-quatre à quarante-huit heures ; on peut le soumettre encore à l'action d'un agitateur mécanique. Puis on centrifuge : le liquide clair qui surnage est cet extrait autolytique, qu'on prend pour antigène. Comme les cultures, il demande à être titré soigneusement.

On verra que, pour la réaction de fixation de la syphilis, on emploie couramment l'extrait d'organes syphilitiques (Voy. *Syphilis : réaction de Bordet-Wassermann*).

Titrage des substances à employer. — La plupart des substances précédentes demandent à être titrées exactement, car, si elles sont utilisées en quantité trop forte ou trop faible, la réaction ne saurait plus avoir la moindre valeur.

Titrage du système hémolytique. — Dans une série de tubes, on verse une même quantité de globules de mouton, une même quantité de complément ou alexine, enfin des quantités variables de sérum hémolytique chauffé, complétées par des quantités inversement correspondantes d'eau physiologique. On porte à l'étuve à 37° pendant quinze à trente minutes. La lecture du tableau indique la technique à suivre mieux que toute description.

	ÉMULSION DE GLOBULES ROUGES à 5 p. 100.	SÉRUM HÉMOLYTIQUE.	COMPLÉMENT.	EAU PHYSIOLOGIQUE.	RÉSULTATS OBTENUS.
	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	
1	1	0,5	0,1	0,4	Hémolyse totale en 15′.
2	1	0,4	0,1	0,5	—
3	1	0,3	0,1	0,6	—
4	1	0,2	0,1	0,7	Hémolyse partielle en 15′, totale en 30′.
5	1	0,1	0,1	0,8	Hémolyse partielle en 30′.
6	1	0,05	0,1	0,85	Hémolyse incomplète.
7	1	0,01	0,1	0,89	Hémolyse = 0.
8 (témoin).	1	»	0,1	0,9	Hémolyse = 0.

Dans cette expérience, les proportions à prendre de préférence sont celles du tube n° 4 où l'hémolyse est partielle en quinze minutes, mais

totale en trente minutes. Il constitue la limite en deçà de laquelle l'activité du sérum est insuffisante et au delà de laquelle elle est trop forte.

Titrage du complément. — Comme il a été dit plus haut, le complément ou alexine sera fourni par du sérum récent de cobaye non chauffé.

On verse dans les tubes à essai une même quantité respective d'hématies et de sérum hémolytique, puis des doses variables d'alexine et d'eau physiologique dans les proportions indiquées par le tableau ci-joint :

TUBES.	ÉMULSION D'HÉMATIES A 5 p. 100.	SÉRUM HÉMOLYTIQUE CHAUFFÉ.	ALEXINE OU COMPLÉMENT	EAU PHYSIOLOGIQUE	RÉSULTATS APRÈS SÉJOUR DE 30 MINUTES A 37°
	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	
1	1	0,1	0,5	0,4	Hémolyse totale.
2	1	0,1	0,3	0,6	—
3	1	0,1	0,1	0,8	Hémolyse partielle.
4	1	0,1	0,05	0,85	—
5	1	0,1	0,02	0,88	—

Dans l'expérience d'essai figurée par ce tableau, c'est la dose indiquée au tube n° 2 qu'il conviendra d'employer : c'est la dose minima amenant l'hémolyse totale en trente minutes à 37°.

Titrage de l'antigène. — Les microbes ou leurs extraits fixent toujours, même sans l'aide d'anticorps spécifiques, une petite quantité de complément. Si l'antigène est en excès, il peut ainsi empêcher l'hémolyse. Le titrage de l'antigène a donc pour but de déterminer la dose minima, non susceptible d'empêcher l'hémolyse.

On opère comme dans les expériences précédentes, en mettant en présence d'un même volume d'hématies, de complément et de sérum hémolytique chauffé, des quantités variables d'antigène, qu'on met préalablement en contact avec le complément pendant deux à trois heures à l'étuve à 37°.

TUBES	ÉMULSION MICROBIENNE OU EXTRAIT	EAU PHYSIOLOGIQUE	COMPLÉMENT.	ÉMULSION D'HÉMATIES A 5 p. 100.	SÉRUM HÉMOLYTIQUE CHAUFFÉ.	RÉSULTATS.
	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	
1	0,1	0,6	0,2	1	0,1	Hémolyse totale.
2	0,2	0,5	0,2	1	0,1	—
3	0,3	0,4	0,2	1	0,1	Hémolyse partielle.
4	0,4	0,3	0,2	1	0,1	—
5	0,5	0,2	0,2	1	0,1	—

La dose à adopter dans le cas particulier est celle du tube 2, dose limite au-dessous de laquelle l'hémolyse est empêchée.

Dispositif et marche de la réaction. — On dispose sur un râtelier une série de tubes où l'on verse successivement les différents matériaux précédents, titrés comme il a été dit :

1° Le sérum, chauffé à 55° pendant une demi-heure, où l'on cherche la présence de la sensibilisatrice vis-à-vis du microbe envisagé ;
2° L'émulsion microbienne, ou l'extrait microbien ;
3° L'alexine ;
4° L'eau physiologique en quantité suffisante pour que le volume total égale 2 centimètres cubes.

Après agitation de chaque tube pour opérer un mélange homogène, on porte à l'étuve à 37° pendant deux à trois heures.

On a préparé en même temps une série de *tubes témoins* (Voy. le tableau) où le sérum supposé sensibilisateur est remplacé dans l'un par du *sérum normal*, également chauffé; dans un autre par de l'*eau physiologique*. Dans d'autres témoins, l'émulsion microbienne ou l'extrait, l'alexine seront remplacés par de l'eau physiologique.

On ne saurait trop, pour éviter les causes d'erreur, multiplier les témoins.

Après les deux à trois heures de séjour à l'étuve, on ajoute à chaque tube le système hémolytique. On replace à l'étuve pendant une heure environ, et l'on observe les résultats.

NUMÉROS.	ÉMULSION MICROBIENNE.	SÉRUM SUPPOSÉ SENSIBILISATEUR.	ALEXINE.	EAU PHYSIOLOGIQUE.	Etuve à 37° pendant 2 à 3 h.	HÉMATIES à 5 p. 100.	SÉRUM HÉMOLYTIQUE.	Etuve à 37° pend. 1/2 h. à 1 h.	RÉSULTATS.
1	0,2	0,1	0,05	0,55		1	0,1		Pas d'hémolyse.
2	0,3	0,1	0,05	0,45		1	0,1		—
3	0,2	0,2	0,05	0,45		1	0,1		—
4	0,3	0,2	0,05	0,35		1	0,1		—
5 (témoin)	0,3	0,1 (sér. normal.)	0,05	0,45		1	0,1		Hémolyse totale.
6 (témoin)	0,3	0,2 (sér. normal.)	0,05	0,35		1	0,1		—
7 (témoin)	0,3	»	0,05	0,55		1	0,1		—
8 (témoin)	»	»	0,05	0,85		1	0,1		—
9 (témoin)	»	»	»	0,90		1	0,1		Pas d'hémolyse.

On voit ainsi que, dans les quatre premiers tubes, où l'antigène a été mis en présence du sérum supposé sensibilisateur, l'hémolyse a

été empêchée. D'où cette déduction naturelle que l'antigène a fixé le complément : par conséquent, le sérum contenait une sensibilisatrice spécifique vis-à-vis de cet antigène. La réaction s'est régulièrement effectuée, sans cause d'erreur, car nous voyons l'hémolyse se présenter dans tous les tubes témoins. Dans le tube n° 9 seul, ne contenant que le système hémolytique, l'hémolyse ne s'est pas produite, car l'alexine était absente.

Applications pratiques. — La réaction de fixation de Bordet-Gengou a été appliquée en maintes circonstances à la pratique bactériologique journalière.

Diagnostic des maladies infectieuses. — On peut, par ce procédé, faire le diagnostic d'un certain nombre de maladies infectieuses en mettant en présence du sérum chauffé de malades les bactéries que l'on suppose avoir infecté ces derniers et avoir, par conséquent, engendré dans ce sérum les anticorps correspondants.

C'est ainsi que Widal et Le Sourd ont étudié une méthode de diagnostic de la *fièvre typhoïde*, en mettant en évidence, par la réaction de fixation, la sensibilisatrice vis-à-vis du bacille typhique. Dopter a procédé de la même façon pour la *dysenterie bacillaire*, la *méningite cérébro-spinale*, Ch. Nicolle et Sicre pour la *fièvre de Malte*. C'est aussi sur cette épreuve qu'est basée la réaction dite de Wassermann pour le diagnostic de la *syphilis*. Widal et ses élèves l'ont appliquée au diagnostic de la *sporotrichose* et de diverses *mycoses* ; Bordet et Gengou au diagnostic de la *coqueluche* ; Weinberg et Parvu en ont tiré parti pour reconnaître chez un sujet l'existence de l'*échinococcose*. Des recherches en ce sens ont été faites aussi avec le bacille tuberculeux et les para-tuberculeux.

Identification des microbes. — Cette réaction de fixation peut être utilisée dans un but tout différent. En partant d'un antisérum connu, on peut assurer le diagnostic d'une espèce microbienne. C'est grâce à cette épreuve que certains germes ont été reconnus comme agents pathogènes de maladies infectieuses : témoin le microbe de la coqueluche, auquel Bordet et Gengou ont pu ainsi attribuer le rôle spécifique dans l'étiologie de cette affection.

Dosage des sérums. — Enfin cette réaction a permis à Wassermann d'imaginer une méthode de dosage du sérum antiméningococcique, en en utilisant des doses progressivement décroissantes et en déterminant ainsi la quantité minima de sérum nécessaire pour empêcher l'hémolyse.

Sensibilisatrices et bactériolysines spécifiques et non spécifiques. — Les sensibilisatrices et les bactériolysines sont en général douées d'une étroite spécificité. Telle est, du moins,

l'opinion courante. Cependant, l'expérience montre qu'il n'en est pas toujours ainsi. Par exemple : le sérum d'un cheval immunisé contre le méningocoque contient une sensibilisatrice spécifique vis-à-vis de ce germe, mais aussi une sensibilisatrice vis-à-vis des méningocoques B et C (anciens paraméningocoques) qui, les recherches d'agglutination et de sérothérapie le démontrent avec la plus grande évidence, sont doués d'une spécificité différente. La sensibilisatrice vis-à-vis de B et C est donc vraisemblablement une *co-sensibilisatrice* ou sensibilisatrice de groupe. Aucun procédé n'a permis jusqu'alors de les dissocier.

Il en est de même pour les bactériolysines : un sérum anti-méningococcique (anti-A) contient une bactériolysine spécifique (épreuve du péritoine) vis-à-vis de ce germe, mais aussi parfois des *co-bactériolysines* vis-à-vis des méningocoques B et C. Et inversement. L'épreuve de la *saturation des bactériolysines* (Dopter et Pauron) permet de les séparer de la bactériolysine spécifique.

Cette notion nouvelle permet de conclure à une grande analogie existant à cet égard entre les divers anti-corps connus : agglutinine, précipitine, etc.

POUVOIR OPSONISANT, OPSONINES, BACTÉRIOTROPINES.

Wright a fait connaître, sous le nom d'*opsonines*, des substances qu'il croyait spéciales, contenues dans les sérums normaux et surtout les sérums spécifiques, qui prépareraient les bactéries à subir la phagocytose ; elles avaient pour effet d'exagérer cette dernière et de la rendre plus efficace. Pour Wright, les opsonines étaient indispensables à la phagocytose : sans elles, la phagocytose ne pouvait s'exercer (*opsono : je prépare pour l'alimentation*).

En réalité, la phagocytose spontanée existe. Bordet, dès 1895, l'avait démontrée dans les expériences *in vitro*, où il mettait en présence des leucocytes et du Vibrion cholérique, du Streptocoque, du *Proteus vulgaris*, etc., sans addition de sérum opsonisant. Metchnikoff avait aussi constaté la phagocytose de la Bactéridie charbonneuse par des leucocytes en suspension dans l'humeur aqueuse bouillie, et dépourvue de substances pouvant l'inciter à se produire.

Les recherches de Wright et Douglas démontrèrent par contre que les *sérums frais provenant d'animaux normaux* étaient doués d'un certain degré de pouvoir opsonisant, car ils favorisent la phagocytose. Leurs expériences sur le Vibrion cholérique, le Bacille typhique, le Bacille pesteux, le Staphylocoque et le Streptocoque, etc., étaient très probantes à cet égard. Haktœn a montré depuis que les

Trypanosomes se laissent aisément influencer de la même façon. Il en est de même des Spirilles, d'après Levaditi et Roché. Mais les sérums normaux ne seraient pas doués de ce pouvoir vis-à-vis de tous les germes : le Bacille diphtérique, le Bacille de la xérose ne subissent aucunement son influence.

Quant aux *sérums spécifiques*, ils jouissent d'un pouvoir opsonisant beaucoup plus élevé que celui des sérums normaux. Dès 1895, bien avant Wright, Denys et Leclef avaient observé que le sérum d'un lapin vacciné contre le Streptocoque, mélangé *in vitro* à des leucocytes et des streptocoques, exerçait sur ces derniers une phagocytose intense, alors que le sérum normal était presque inactif. On ne pouvait pas mieux mettre en évidence les propriétés opsonisantes d'un sérum spécifique. Mennes fit des constatations identiques sur le Pneumocoque, Sawtchenko sur le Spirille de la fièvre récurrente et le sérum antispirillaire. Ces données essentielles furent reprises par Wright et interprétées comme afférentes au pouvoir opsonisant des sérums spécifiques. Neufeld et Rimpau les confirmèrent, mais en dénommant *bactériotropines* les opsonines spécifiques de Wright.

Nature des opsonines. — Wright, avons-nous dit, avait pensé que les opsonines étaient des substances spéciales existant dans tout sérum normal, mais dont la production était exagérée dans les sérums spécifiques, sous l'influence de la vaccination. Les recherches ultérieures ont montré qu'il n'en était pas ainsi ; d'après les travaux récents, il y a lieu de distinguer, à cet égard, les opsonines des sérums normaux et celles des sérums spécifiques.

Opsonines des sérums normaux. — D'après Becher, Neufeld, Levaditi et Inmann, le pouvoir opsonisant des sérums normaux serait lié à l'alexine ou complément. En effet, comme l'alexine, cette opsonine est thermolabile ; elle disparaît sous l'action du chauffage à 55°. Puis on peut réaliser avec l'opsonine toutes les recherches de fixation que l'on effectue avec l'alexine. En réalité, il ne s'agit pas là d'une nouvelle substance, mais d'une fonction nouvelle de l'alexine.

Opsonines des sérums spécifiques. — Elles diffèrent notablement des opsonines des sérums normaux ; contrairement à ces dernières, elles résistent au chauffage à 56° ; elles sont donc *thermostabiles*. D'autre part, l'opsonine normale se fixe indifféremment sur tout corps bactérien ; les opsonines spécifiques ne sont au contraire absorbées et fixées que par les germes ayant servi à la vaccination de l'animal d'où provient le sérum. Par ces propriétés, les opsonines spécifiques se rapprochent des sensibilisatrices ou ambocepteurs spécifiques des immun-sérums.

Nombre d'auteurs assimilent la sensibilisatrice et l'opsonine spécifique. Les sensibilisatrices, d'après cette conception, non seulement auraient la fonction de sensibiliser et de bactériolyser l'antigène, mais encore seraient capables de provoquer la phagocytose quand elles se trouvent en présence des leucocytes frais et des bactéries ayant servi à sa préparation.

Neufeld, cependant, établit une distinction entre la sensibilisatrice et l'opsonine spécifique, qu'il a baptisée *bactériotropine*. Pour lui, des sérums spécifiques peuvent être riches en ambocepteurs et pauvres en bactériotropines, et inversement. Il est vrai d'ajouter qu'un sérum peut ne pas posséder ces caractères au même degré.

Recherche des opsonines. — ***Préparation du matériel nécessaire.*** — Toute recherche d'opsonines exige la préparation : 1° de sérum : 2° de leucocytes ; 3° d'émulsion microbienne.

Récolte du sérum. — On recueille le sérum à examiner en piquant simplement l'extrémité du doigt ou le lobule de l'oreille, de préférence en dehors de la période digestive. On le laisse s'écouler dans un petit tube où il se coagule ; on aspire le sérum dans une pipette fine.

Recueillir de la même façon et au même moment du sérum de sujet normal.

Ces deux sérums doivent être mis à l'étude le plus tôt possible, car l'activité des opsonines qu'ils contiennent baisse rapidement.

Préparation des leucocytes. — Pour avoir des leucocytes normaux, on recueille du sang de préférence chez l'homme sain. Serrer la racine du pouce à l'aide d'une bande ; désinfecter, puis pratiquer sur la face dorsale une série de piqûres ; les piqûres seront faites de préférence avec une pointe de verre effilée à la lampe. Laisser le sang s'écouler goutte à goutte dans un tube à centrifugation, où l'on a préalablement versé environ 10 centimètres cubes d'eau salée à 8 p. 1 000 et citratée (2 p. 100 de citrate de soude) pour empêcher la coagulation.

Bien mélanger et centrifuger pendant un quart d'heure. Quand la centrifugation est terminée, décanter et ajouter un même volume du liquide

Fig. 20. — Pipette de Wright.

précédent. Recentrifuger, redécanter, et laisser reposer le tube un peu incliné ; on perçoit à la surface une couche blanchâtre constituée en grande partie par des leucocytes ; c'est dans cette couche qu'à l'aide d'une pipette spéciale (fig 20) on puisera pour recueillir ces éléments.

Préparation de l'émulsion microbienne. — A l'aide d'une anse de platine, prélever une parcelle d'une culture jeune sur gélose inclinée, âgée de vingt-quatre heures au plus ; délayer cette parcelle dans un petit tube contenant 1 à 2 centimètres cubes d'eau physiologique et l'émulsionner d'une façon très homogène en évitant les grumeaux. L'émulsion ainsi

obtenue devra être légèrement louche ; une émulsion trop épaisse contient trop de microbes, et le résultat final est difficilement appréciable.

Quand on opère sur le bacille tuberculeux, il faut choisir une culture en bouillon de quatre à six semaines. Stériliser à 110°, filtrer sur papier, et laver dans l'eau physiologique. Broyer le dépôt dans un mortier et émulsionner dans de l'eau salée à 1,5 p. 100, ajoutée goutte à goutte. Répartir en tubes et stériliser à 115°. Dans la réaction, éviter de prélever les grumeaux qui se déposent d'ailleurs dans la partie inférieure des tubes.

Technique de la recherche. — Avoir à sa disposition un tube de verre de 4 à 9 millimètres de diamètre, effilé à la flamme, et pourvu à sa large

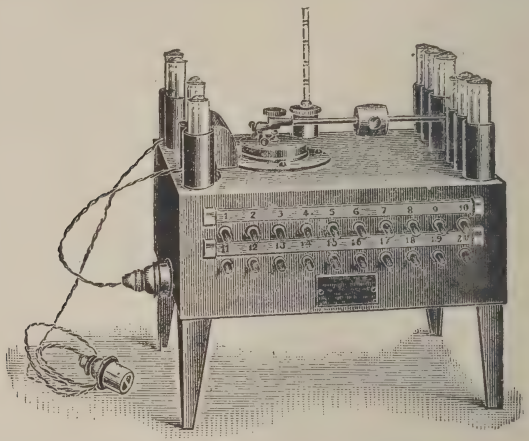

Fig. 21, — Etuve opsonique de Hearson.

extrémité d'une tétine de caoutchouc pour assurer l'aspiration (fig. 20). Tracer un trait au crayon gras à 2 centimètres de l'extrémité fine, coupée au couteau à verre.

1° Tremper l'extrémité de cette pipette dans la couche blanche de leucocytes, et aspirer jusqu'à ce que la colonne leucocytaire ainsi puisée s'arrête au trait marqué ; laisser pénétrer une petite bulle d'air. Puis aspirer de la même façon une quantité égale du sérum à l'étude ; laisser pénétrer une petite bulle d'air ; enfin introduire toujours jusqu'au trait une troisième colonne d'émulsion microbienne.

2° Par pression de la tétine, chasser ensuite sur une lame de verre où elles se mélangent, les trois colonnes obtenues, et aspirer à nouveau ce mélange dans la pipette. Sceller à la flamme l'extrémité fine de cette dernière.

On répète cette technique point par point, en remplaçant le sérum à expertiser par du sérum normal.

3° Porter les tubes ainsi préparés à l'étuve à 38°. On se sert avec avantage d'une étuve dite « étuve opsonique » de Hearson (fig. 21). On les y laisse pendant quinze minutes.

4° Après brisure de l'extrémité de la pipette, mélanger à nouveau sur une lame le contenu de chaque pipette et faire des frottis sur lame comme on pratique habituellement les étalements de sang.

5° Fixer les frottis par l'alcool ou la chaleur. Colorer.

Observer ensuite au microscope avec l'objectif à immersion ; quand le sérum est doué de propriétés opsonisantes, on constate qu'un grand nombre de germes sont phagocytés (fig. 23) ; avec le sérum normal, la plupart sont libres et perceptibles entre les leucocytes (fig. 22).

Détermination de l'indice opsonique. — L'*indice opsonique* ne peut être déterminé qu'en comparant le pouvoir opsonisant ou

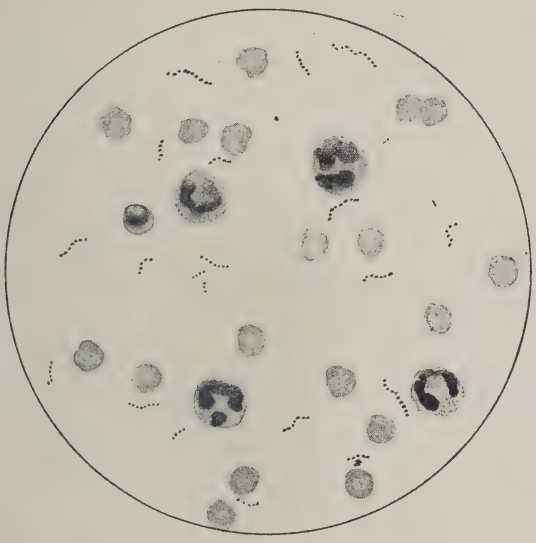

Fig 22. — Phagocytose absente (sérum normal).

phagocytaire du sérum supposé spécifique et du sérum normal. C'est, en somme, le rapport existant entre les deux. Voici comment on procède :

On compte tout d'abord le nombre des bactéries incluses dans 100 leucocytes. On en trouve par exemple 182. Le pouvoir opsonique de ce sérum est par conséquent égal à $\frac{182}{100} = 1{,}82$.

On répète le même calcul avec le sérum normal. Supposons que le pouvoir opsonique de ce dernier soit égal à 1,10.

Le rapport entre ces deux chiffres sera l'index opsonique, soit :

$$\frac{1{,}82}{1{,}10} = 1{,}50.$$

Dans cet essai, l'indice opsonique égale 1,50.

Variantes. — *Pour obtenir des globules blancs humains en grande quantité* : prélever le sang dans les veines, le recueillir et le traiter comme ci-dessus.

On peut se servir indifféremment des globules blancs de n'importe quelle espèce animale. On obtiendra facilement des *globules blancs de cobaye* par le procédé suivant: inoculer dans le péritoine 5 à 10 centimètres cubes de bouillon ordinaire ; un exsudat, riche en leucocytes, se produit rapidement. Prélever cet exsudat 24 heures après l'injection, soit par

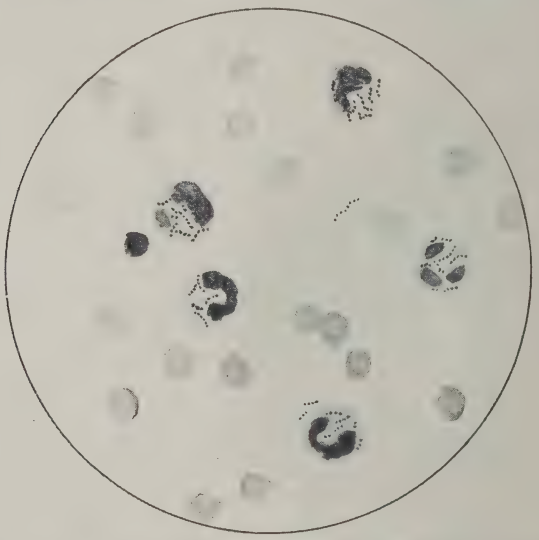

Fig. 23. — Phagocytose de streptocoques obtenue avec un sérum pourvu d'opsonines.

ponction du péritoine, soit, après avoir sacrifié l'animal, par lavage du péritoine. Diluer dans l'eau physiologique, centrifuger.

Recherche des opsonines spécifiques (*bactériotropines*). — Pour rechercher les opsonines spécifiques, il faut tout d'abord se débarrasser des opsonines normales. Dans ce but, le sérum sera inactivé par chauffage à 56° pendant 30 minutes.

Pour doser les opsonines spécifiques : diluer le sérum à des taux variés dans l'eau physiologique, au 10e, au 30e, au 100e, au 300e, etc. Mélanger 0, cc. 1 de chaque dilution avec 0 cc. 1 d'émulsion microbienne et 0 cc. 2 d'émulsion leucocytaire. Comme témoin : mélange de sérum normal, de leucocytes et d'émulsion microbienne. Porter à l'étuve 1 heure 1/2 à 2 heures. Etaler, colorer, examiner. Le titre du pouvoir bactériotropique est indiqué par le titre de la dilution qui amène une phagocytose nette, par rapport au tube témoin.

Applications pratiques. — *Indications diagnostiques.* — Les données précédentes permettent de comprendre comment la

détermination de l'index opsonique d'un sérum de malade peut aider au diagnostic de certaines maladies infectieuses. On sait que, suivant telle ou telle infection, l'index opsonique est supérieur ou inférieur à la normale.

Ainsi, le sérum des sujets non tuberculeux présente pour le bacille de Koch un indice opsonique variant de 0,90 à 1. Chez un sujet atteint de tuberculose circonscrite, l'index s'abaisse à 0,8 à 0,3; s'il s'agit d'une tuberculose aiguë, il monte à 1,20 à 2. Ce sont des bases qui peuvent assurément faire établir un diagnostic hésitant (Wright, Bulloch, Sauerbeck).

Milhit a montré qu'il en était de même pour la fièvre typhoïde : un indice opsonique pour le bacille d'Eberth supérieur à 1,70 chez un sujet suspect, et n'ayant pas eu de fièvre typhoïde antérieure, est un élément de probabilité dans le sens de l'infection typhoïde. Inférieur à 1 ou à 1,20, il permet de rejeter ce diagnostic.

Taylor, Houston et Rankin ont tiré parti de l'élévation de cet indice pour diagnostiquer en certains cas la méningite méningococcique.

Indications pronostiques. — Les indications pronostiques que peut donner l'indice opsonique sont assez limitées, car il ne reflète que l'élévation du pouvoir phagocytaire d'un sérum. Or, dans le pronostic des maladies infectieuses, tout ne se résume pas dans la phagocytose ; il faut tenir compte encore de l'intoxication pour laquelle la méthode ne donne aucune indication.

Néanmoins, Milhit a montré que, dans la fièvre typhoïde, un abaissement brusque de l'indice opsonique au cours de la maladie peut venir confirmer un diagnostic hésitant de perforation intestinale. De même, pendant la défervescence ou la convalescence, une chute analogue peut indiquer une reprise ou une rechute imminente.

De même encore, au cours de la tuberculose, un index stable prouverait que l'affection se circonscrit ; s'il présente des oscillations, on peut penser à la possibilité d'une généralisation.

Indications thérapeutiques. — Wright a utilisé la réaction des opsonines pour contrôler les effets de sa méthode vaccinothérapique et permettre de la diriger à bon escient.

On sait que, pour lutter contre les infections staphylococciques, tuberculeuses, gonococciques, etc., Wright a imaginé d'injecter au malade des émulsions progressivement concentrées des germes correspondants, tués par la chaleur. Mais, pour juger de la quantité de microbes à utiliser pour chaque injection, il fallait se rendre compte des réactions humorales provoquées par ces vaccins ; la recherche de l'indice opsonique lui a permis d'apprécier l'activité phagocytaire du sérum du malade en traitement.

Il a constaté ainsi que la première vaccination était suivie d'une *phase dite négative*, au cours de laquelle l'indice opsonique était notablement abaissé, puis d'une *phase positive*, où il était plus élevé, pour diminuer ensuite à nouveau. Or il remarqua qu'une deuxième vaccination pendant la phase positive augmentait notablement la valeur de l'indice; une vaccination trop énergique au contraire pouvait provoquer une phase négative prononcée, mettant le sujet en état de moindre résistance. La recherche de l'indice opsonique était donc utile, indispensable même, pour doser la quantité de vaccin à employer et choisir le moment propice de l'intervention.

Indications pour le dosage de certains sérums thérapeutiques. — Certains auteurs se sont servis de l'indice opsonique de certains sérums thérapeutiques pour doser leur activité curative. Flexner et Jobling, Kraus et Bæcher en ont fait l'essai pour le sérum antiméningococcique. La recherche et le dosage des opsonines ne donnent cependant en ce cas que des indications limitées uniquement au pouvoir phagocytaire de ce sérum ; il faut tenir compte aussi de son pouvoir antitoxique, que ne révèle pas l'épreuve en question.

POUVOIR ANTITOXIQUE.

Behring et Kitasato ont montré qu'on peut immuniser un animal contre un grand nombre de doses mortelles de toxines diphtérique et tétanique, injectées en quantité progressivement croissante. Le sérum de cet animal ainsi vacciné présente des propriétés antitoxiques incontestables. Ces faits constituèrent les premières bases de la sérothérapie antidiphtérique et antitétanique.

Pour obtenir ces propriétés antitoxiques du sérum, l'injection de toxine n'est pas toujours nécessaire : les vaccinations effectuées à l'aide de microbes seuls, tués ou à l'état vivant, développent des propriétés identiques ; c'est le cas du Bacille dysentérique, du Méningocoque, du Gonocoque, dont le poison élaboré est retenu dans le corps microbien lui-même (endotoxine) ; le sérum des animaux ainsi traités acquiert alors en même temps des propriétés antimicrobiennes et anti-endotoxiques.

Enfin on peut faire naître dans le sérum des propriétés antitoxiques avec des toxines étrangères aux toxines microbiennes : l'abrine, la ricine (Ehrlich), le venin de serpent (Calmette), le sérum d'anguille (Richet et Héricourt), etc.

Comme les toxines, les antitoxines sont sensibles à la température ; elles sont précipitées par l'alcool et ont été assimilées à des diastases dont elles présenteraient les propriétés essentielles.

Mélangées *in vitro* avec la toxine correspondante, elles annihilent l'action de cette dernière. Le fait s'observe ainsi *in vivo* : on injecte à un animal sensible en proportion déterminée, et simultanément, de la toxine tétanique et de l'antitoxine tétanique (sérum antitétanique) : l'animal survit, alors que les témoins succombent.

Behring et Kitasato avaient pensé que l'antitoxine neutralisait la toxine et agissait ainsi à la manière d'un acide vis-à-vis d'une base, ou inversement. Roux, puis Calmette ont démontré que, dans le mélange antitoxine-toxine, les effets de la toxine sont en effet annihilés, mais la toxine n'est pas détruite, car on peut la mettre en évidence et lui faire récupérer son activité par des moyens artificiels (Voy. *Immunité*, p. 45). L'antitoxine se fixe donc sur la toxine, mais ne la détruit pas.

POUVOIR PRÉVENTIF ET POUVOIR CURATIF.

Pouvoir préventif. — Injectons sous la peau d'une souris du sérum antipesteux, puis une dose de culture de bacille pesteux, mortelle pour les témoins : l'animal survivra, alors que les témoins n'ayant reçu que la culture succomberont invariablement.

Cette expérience, au milieu de tant d'autres effectuées avec des sérums différents et les bactéries ou toxines correspondantes, prouve nettement le pouvoir préventif d'un sérum spécifique.

De semblables faits rentrent dans le cadre de l'*immunité* dite *passive*. Mais cette immunité est passagère, et la préservation conférée par l'injection préalable d'antisérum ne dure que douze à quinze jours.

Pouvoir curatif. — Soit un lapin inoculé sous la peau à l'aide d'une dose sûrement mortelle de bacille dysentérique ; le lendemain, on lui injecte sous la peau, en un point différent, ou dans les veines, du sérum antidysentérique : il survit, alors que les témoins succombent en trois à quatre jours.

Il en est de même pour d'autres sérums dont les propriétés curatives sont indéniables, non seulement chez l'animal, mais chez l'homme. Les effets merveilleux de la méthode sérothérapique dans le traitement des maladies infectieuses en constituent des preuves indiscutables. Au fur et à mesure de l'étude des diverses bactéries, nous ferons connaître les propriétés curatives des sérums destinés à lutter contre les infections ou intoxications qu'elles provoquent.

CHAPITRE V

ANAPHYLAXIE

Il était admis qu'un poison, une toxine, introduits dans l'organisme d'un animal à doses progressivement croissantes arrivaient à créer chez ce dernier une grande résistance, autrement dit l'immunité. Or, en 1902, Ch. Richet a montré que cette règle comportait des exceptions. Il a observé que certaines catégories de poisons (actino-congestine notamment), loin d'immuniser, rendaient au contraire l'animal plus sensible que jamais à son action, au point de le faire succomber rapidement avec une dose infinitésimale, incapable de le tuer lors de la première injection. Cet état particulier d'*hypersensibilité*, il l'a nommé *anaphylaxie* (ἀνὰ-φυλάσσειν, *contre-protéger*).

Cette découverte a été le point de départ de travaux innombrables, qui permirent de comprendre une foule de phénomènes restés inexplicables dans le domaine de la bactériologie et de la biologie.

Manifestations expérimentales de l'anaphylaxie. — ***Expériences de MM. Richet et Portier sur l'actino-congestine.*** — Ch. Richet et Portier, étudiant l'actino-congestine (précipité alcoolique de macération aqueuse de tentacules d'actinies), ont établi que l'injection chez le chien de 0gr,08 de cette substance par kilogramme d'animal provoque de l'abattement, de la diarrhée avec ténesme, puis un affaiblissement progressif, de l'hypothermie aboutissant à la mort en trois jours environ. Ils avaient noté l'absence complète de troubles nerveux.

Or à une dose moindre (0gr,05 par kilogramme), les symptômes sont plus légers, et, au bout de dix à douze jours, quoique très amaigri, l'animal se rétablit complètement, au point qu'il ne peut être distingué d'un animal normal.

Cependant si, trois semaines après la première injection, on lui inocule une dose vingt fois moindre que la dose initiale (0gr,0025 dixièmes de milligramme), il présente immédiatement des troubles graves (vomissements, dyspnée intense, hypotension artérielle, dépression du système nerveux, paraplégie, etc.), qui peuvent entraîner rapidement la mort.

Ch. Richet et Portier notèrent expressément que ces symptôme différaient totalement de ceux que l'animal présentait lors de la première injection, même à dose mortelle. Ces troubles n'apparaissent pas quand la deuxième injection suit de près la première; pour qu'ils se produisent, il faut comme une période d'incubation de deux à trois semaines, et c'est vers la sixième semaine que l'état d'hypersensibilité atteint son maximum.

Enfin le sérum d'un chien sensibilisé par une première injection, injecté à un chien neuf, provoque immédiatement des troubles identiques.

Ch. Richet et Portier, répétant ces expériences avec d'autres substances, obtinrent des résultats analogues avec divers poisons extraits du corps de moules, huîtres, crevettes, etc., la *mytilo-congestine*, la *crépitine*.

Expériences et phénomène d'Arthus. — Ch. Richet et Portier avaient opéré sur des substances naturellement toxiques. Arthus, dans une série de nouvelles expériences, montra que des phénomènes d'hypersensibilité pouvaient être obtenus avec des produits dénués de toute toxicité, notamment des albumines et particulièrement le sérum de cheval.

On peut injecter inpunément au lapin, sous la peau ou dans le péritoine, de fortes doses de sérum de cheval (10 à 12 centimètres cubes, par exemple) sans provoquer le moindre trouble.

Mais si on pratique chez cet animal, tous les quatre à cinq jours, des injections de 5 centimètres cubes du même sérum, on observe tout d'abord une réaction locale, minime : un peu d'œdème se développe au point de la dernière inoculation ; après la troisième ou quatrième injection, la réaction augmente d'intensité, au point de provoquer un *œdème pseudo-phlegmoneux* (stérile à l'ensemencement), et au bout de la cinquième ou sixième injection, il se produit de la *gangrène* et de la *nécrose aseptique*.

C'est l'ensemble de ces troubles particuliers que l'on caractérise actuellement sous le nom de *phénomène d'Arthus*.

Si, chez un lapin qui a reçu sous la peau six à huit injections semblables, on pratique une injection intraveineuse de 2 centimètres cubes du même sérum, des phénomènes nerveux (dyspnée, paraplégie, coma, etc.) se déclarent immédiatemment : l'animal succombe rapidement ; s'il se remet, il devient cachectique et meurt en quatre à cinq semaines.

Phénomène de Theobald Smith. — A ces faits, Th. Smith ajouta les données suivantes : il constata que les cobayes ayant servi au dosage du sérum antidiphtérique, inoculés par conséquent avec

le mélange toxine-sérum, étaient très sensibles à l'injection sous-cutanée ou intrapéritonéale d'une nouvelle dose de sérum; en effet, la plupart succombent rapidement après cette dernière, même quand la dose est minime. Dans ces expériences, il est à remarquer que l'état d'anaphylaxie est créé par une seule injection de sérum de cheval, en raison sans doute de l'injection concomitante de toxine diphtérique.

Les travaux d'Otto, de Rosenau et d'Anderson, de Besredka ont confirmé ces notions; ils ont montré en outre que ces troubles sont bien spécifiques pour le sérum du cheval, car, si à la deuxième injection le cobaye reçoit un sérum d'espèces étrangères (sérum de bœuf, de mouton, par exemple), ils ne se produisent pas. De plus, la réaction apparaît d'autant plus rapidement que la dose initiale de sérum est plus faible : avec 1/100 de centimètre cube, on sensibilise le cobaye beaucoup mieux qu'avec 1 centimètre cube. Enfin, pour que l'état anaphylactique apparaisse, une période d'incubation est nécessaire; on l'estime en général à dix ou douze jours.

Besredka enfin a montré que l'injection intracérébrale était le meilleur procédé pour mettre en évidence l'anaphylaxie du cobaye au sérum.

Soit, par exemple, un cobaye neuf, qui a reçu sous la peau 1/100 de centimètre cube de sérum de cheval; quinze jours après, on lui injecte sous la dure-mère ou dans le cerveau 1/20 de centimètre cube du même sérum; il est pris immédiatement des troubles classiques : toux, dyspnée, soubresauts, convulsions, puis apnée, et il meurt en trois à cinq minutes. Un cobaye neuf peut supporter impunément dans le cerveau $0^{cc},5$ de sérum.

Des phénomènes anaphylactiques identiques peuvent être obtenus dans les mêmes conditions avec différentes substances : *albumine du blanc d'œuf*, *lait*, *peptone*, *sperme* (expériences de Minet et Leclercq, chez le cobaye, avec le sperme humain).

Manifestations anaphylactiques chez l'homme. — ***Anaphylaxie sérique.*** — Depuis un certain nombre d'années, on s'est mis à étudier les troubles survenant après les injections des sérums utilisés en sérothérapie. Ils diffèrent suivant la voie d'introduction.

Injections sous-cutanées. — Un sujet qui a reçu une injection sous-cutanée de sérum thérapeutique quelconque n'en éprouve habituellement aucun dommage : parfois cependant, dans 14 ou 15 p. 100 des cas, suivant Weill-Hallé et Lemaire, vers le huitième ou dixième jour, apparaissent les *accidents* dits *sériques* caractérisés par des érythèmes ortiés, ou l'érythème marginé aberrant de Marfan, des arthralgies diverses, troubles accompagnés ou non de fièvre.

A côté de ces faits, Von Pirquet et Schick ont décrit, sous le nom de *maladie du sérum*, des phénomènes qui surviennent après une *réinjection* de sérum, pratiquée au moins sept à huit jours après la première. En ce cas, les accidents surviennent sans période d'incubation, immédiatement ou quelques heures après la deuxième injection ; ils consistent en une réaction locale assez marquée, avec rougeur, tuméfaction, suivie d'une éruption ortiée prurigineuse. Celle-ci se généralise rapidement, s'accompagnant de bouffissure de la face, des paupières, de la langue. Il peut se produire de la toux, de l'angoisse précordiale, de l'albuminurie ; le plus souvent la température s'élève à 38° ou 39°. Ces troubles ne durent pas plus de vingt-quatre à quarante-huit heures.

Les ganglions afférents au territoire inoculé s'engorgent fréquemment. Si les injections sont encore répétées, on finit par observer au point d'inoculation un œdème pseudo-phlegmoneux et même de la gangrène et de la nécrose. Von Pirquet et Schick, Marfan ont assimilé, à juste titre, ces accidents au phénomène d'Arthus, décrit chez le lapin.

Injections intraveineuses. — Si la deuxième injection est pratiquée dans les veines, il n'existe pas de réaction locale, mais on constate immédiatement après, parfois même pendant l'injection, une rougeur généralisée, voire même de la cyanose ; les yeux sont exorbités; l'angoisse précordiale est intense ; parfois un état syncopal se déclare ; ces accidents durent dix minutes à un quart d'heure et disparaissent.

Injections intrarachidiennes . — Les réinjections intrarachidiennes de sérum pratiquées chez les malades atteints de méningite cérébro-spinale provoquent parfois des accidents de deux catégories.

En certains cas, il se produit une véritable *méningite sérique*.

En effet, trois à quatre heures après une nouvelle injection de sérum, la céphalée s'accroît et, avec elle, la rachialgie ; les signes méningés augmentent. La température s'élève à 39° ou 39°,5. Ces phénomènes disparaissent au bout de douze heures, mais se reproduisent régulièrement et s'exagèrent même de plus en plus à chaque nouvelle intervention. Ils cessent, au contraire, si l'on cesse la sérothérapie. Cette constatation fournit donc la preuve la plus évidente que la réaction méningée en question est provoquée par l'introduction du sérum dans la cavité rachidienne (Sicard et Salin).

De plus, le liquide céphalo-rachidien devient jaunâtre, de teinte ambrée, due à de petites hémorragies capillaires provenant de la méningite. Chez certains sujets, il devient même louche, trouble ; le microscope révèle une polynucléose plus ou moins marquée,

mais les polynucléaires sont dans un état d'intégrité parfaite.

Pour Hutinel et Darré, cette réaction locale, qui reste cantonnée à la méninge, est due, selon toute vraisemblance, à un véritable phénomène d'Arthus.

Dans une deuxième catégorie de faits, on assiste au tableau clinique, décrit plus haut, de l'*anaphylaxie* proprement dite. Les symptômes éclosent en général très rapidement, parfois même pendant la réinjection. Ils sont souvent bénins, mais peuvent, en certains cas, prendre une intensité marquée, capable d'entraîner la mort (Hutinel et Darré). Cette gravité tient à ce que le sérum est mis en contact direct avec l'axe nerveux, rappelant un peu les expériences de Besredka sur l'introduction sous-dure-mérienne du sérum chez le cobaye.

Anaphylaxie à la tuberculine et à la malléine. — Von Pirquet, à la suite de ses observations sur la maladie du sérum, avait rapporté à un trouble de même nature les réactions vaccinales abortives que l'on constate chez les sujets en état d'immunité vaccinale, et décrites jusqu'alors sous le nom de fausse vaccine. Il établit le même rapprochement avec les réactions générales, mais passagères, que provoque une injection de tuberculine chez les tuberculeux. Il les interpréta comme des réactions anaphylactiques. C'est alors que, dans un but diagnostique, il réalisa l'anaphylaxie tuberculeuse locale, en provoquant la *cuti-réaction*, bientôt suivie de l'*ophtalmo-réaction* (Calmette) et plus tard de l'*intradermo-réaction* (Mantoux).

Ces phénomènes seront décrits lors de l'étude du bacille de la tuberculose; ils relèvent de l'anaphylaxie à la tuberculine.

Il en est de même de la réaction à la malléine chez les animaux morveux (Voy. *Morve*).

Anaphylaxie au liquide de kyste hydatique. — Chauffard et Boidin ont rapporté avec juste raison à l'anaphylaxie les accidents que l'on observe à la suite de l'issue du liquide hydatique hors du kyste, lors d'une ponction exploratrice ou d'une opération chirurgicale sur ce kyste. Ces accidents se caractérisent par un malaise subit avec angoisse, prurit, attaques épileptiformes et même mort rapide par collapsus cardiaque. Et cependant, expérimentalement, le liquide hydatique n'est pas toxique, mais une première injection inoffensive sensibilise l'animal, qui présente des accidents anaphylactiques lors d'une deuxième injection intracérébrale pratiquée quinze jours après.

Anaphylaxie alimentaire. — Hutinel a montré que, chez le nourrisson, le *lait de vache* provoque parfois des accidents (vomis-

sements, diarrhée, refroidissement, pouls filiforme, éruptions ortiées); il les attribue à l'anaphylaxie.

Les *œufs* (particulièrement le jaune d'œuf) donnent lieu à des troubles de même nature (Lesné). Il en est de même de la *viande de veau* ou *de porc*.

L'ingestion de *poissons*, *crustacés*, *mollusques* et notamment de moules, détermine souvent des troubles identiques qu'on rapporte à la même cause.

Enfin les *graisses* seraient responsables de phénomènes de même nature.

Mécanisme de l'anaphylaxie. — Le mécanisme de l'anaphylaxie a été envisagé de différentes façons par les auteurs.

Théorie de Ch. Richet. — Ch. Richet, se basant sur ce fait que l'anaphylaxie ne se produit qu'après une période d'incubation, affirme que ce phénomène ne peut être dû qu'à l'accumulation d'un poison dans l'organisme. Il estime qu'il se prépare dans l'organisme une substance nouvelle, non toxique par elle-même, mais pouvant devenir très toxique en présence d'une nouvelle dose du produit inoculé. Cette substance nouvelle se rencontre dans le sang, car l'injection à un animal neuf du sérum d'animal anaphylactisé sensibilise le premier, comme s'il avait reçu préalablement une injection du produit sensibilisant; une seconde injection de ce dernier déchaîne les accidents dits anaphylactiques. Il nomme cette substance la *toxogénine*. Lors d'une deuxième injection du produit sensibilisant, ce dernier se combine avec la toxogénine pour former une autre substance de nature différente, l'*apotoxine*, très toxique, poison du système nerveux, et donnant lieu à une symptomatologie spéciale, celle du choc anaphylactique.

Achard et Flandin ont montré dans la suite que cette apotoxine de Richet siégeait au niveau des centres nerveux : les extraits de bulbe d'un cobaye mort de choc anaphylactique, injectés dans le cerveau de cobayes neufs, produisent chez ces derniers des accidents rappelant le choc anaphylactique.

Théorie de von Pirquet et Schick. — D'après von Pirquet et Schick, l'injection du produit sensibilisant (le sérum de cheval dans leurs expériences) agit en qualité d'antigène et détermine la formation d'anticorps. Lors d'une deuxième injection de sérum de cheval, pratiquée douze jours après la première, il se produit une combinaison brusque entre l'antigène et l'anticorps, d'où résulteraient le choc anaphylactique et les accidents qui le caractérisent.

Théorie de Besredka. — D'après Besredka, la première injection d'antigène détermine dans l'organisme la production d'un

anticorps qui se développe en dix à douze jours ; il le nomme *sensibilisine*, correspondant à la toxogénine de Ch. Richet. Cette sensibilisine se fixe, au fur et à mesure de sa formation, sur la cellule nerveuse. Ce serait au niveau de cette dernière que la rencontre de l'antigène et de la sensibilisine s'opérerait pour déterminer le choc anaphylactique. Cette hypothèse expliquerait la sévérité de l'injection intracérébrale, et aussi ce fait que la narcose par l'éther, le chloroforme empêche l'anaphylaxie de se produire, en annihilant les fonctions réceptrices de la cellule nerveuse vis-à-vis des poisons.

Mais les phénomènes se passeraient d'une façon plus complexe. Pour expliquer que les faibles doses d'antigène sont plus anaphylactisantes que les fortes doses, Besredka admet que la sensibilisine, dans ce dernier cas, est neutralisée par une antisensibilisine ; pour lui, tout sérum de cheval contiendrait deux substances : la première, qu'il nomme *sensibilisinogène*, thermostabile, et donnant naissance à la sensibilisine ; la seconde, *antisensibilisine*, thermolabile. Et ce serait la rencontre subite de la sensibilisine et de l'antisensibilisine au niveau de la cellule nerveuse qui provoquerait le choc auquel on assiste lors de l'injection intracérébrale.

Théorie de M. Nicolle. — M. Nicolle admet que l'injection d'un antigène quelconque détermine dans l'organisme la production de deux sortes d'anticorps, les uns coagulants, les autres « décoagulants » ou lytiques. Et suivant que les premiers ou les seconds prédominent, coagulines ou lysines, on assiste à la production de phénomènes d'immunité ou d'hypersensibilité. Dans l'anaphylaxie, les lysines agiraient directement, sans l'aide préalable des coagulines et opéreraient la dissolution brutale des cellules, microbes, toxines ou albumines agissant en qualité de corps sensibilisants. Les phénomènes anaphylactiques seraient analogues à ceux que déterminent les « poisons de Vaughan », c'est-à-dire les poisons contenus au sein des albuminoïdes et des cellules les plus diverses, et obtenus en les traitant par l'action de la soude en solution alcoolique.

Pour M. Nicolle, l'anti-anaphylaxie, qui sera étudiée plus loin, résulterait de la baisse du pouvoir lytique du sérum.

Théorie de Vaughan. — Vaughan et Wichler, partant de leurs expériences sur l'albumine de l'œuf, pensent que la première injection d'ovalbumine (blanc d'œuf) au cobaye développe dans l'organisme la production d'un ferment (zymogène). Lors de la deuxième injection, ce ferment mettrait en liberté, comme le fait l'alcool sodique dans les expériences précitées, et par dédoublement ou clivage de la molécule d'albumine, un produit toxique ayant une affinité particulière pour le système nerveux.

Théorie de Biedl et Kraus. — Bield et Kraus, frappés par l'analogie des troubles constatés dans l'anaphylaxie avec ceux que détermine une injection de peptone chez le chien (chute brusque de la tension artérielle et incoagulabilité du sang), pensent que le sérum d'animal sensibilisé possède le pouvoir de transformer la substance sensibilisante en un produit nouveau, qui serait une peptone ou une variété de peptone. Cette substance provoquerait une vasodilatation périphérique et de l'hypotension artérielle : le rôle du système nerveux central serait nul.

Nombre d'autres théories ont été proposées ; mais on ne saurait s'étendre outre mesure sur ce sujet, dont nous avons exposé les interprétations principales.

Spécificité de l'anaphylaxie. — La question de la spécificité de l'anaphylaxie a soulevé de nombreuses discussions. Pour les uns, Ch. Richet entre autres, cette spécificité est absolue. On constate en effet que le sérum de cheval anaphylactise le cobaye uniquement pour le sérum de cheval. On a même tiré un parti élégant de cette spécificité dans les expertises de médecine légale.

Yamanouchi a vu que le cobaye anaphylactisé au sérum humain ou au sérum de chimpanzé ne réagit pas au sérum du singe inférieur.

Pour d'autres (Rosenau et Anderson), la spécificité serait relative, des cobayes préparés avec du sérum de vache réagissant dans une certaine mesure au sérum de cheval et de mouton (Bruynoghe).

D'une façon générale, une substance albuminoïde anaphylactise surtout et parfois exclusivement vis-à-vis de la même substance prise comme antigène, ou du moins vis-à-vis de substances très rapprochées.

Pour Arthus, l'anaphylaxie serait dénuée de spécificité, car un cobaye anaphylactisé au sérum de cheval, inoculé avec de l'ovalbumine, subit le choc anaphylactique ; la réciproque serait vraie.

Anti-anaphylaxie. — Rosenau et Anderson, Besredka ont montré qu'on pouvait empêcher l'anaphylaxie sérique chez un animal, en injectant des doses massives (5 centimètres cubes) et répétées tous les six jours. Après trois à quatre injections semblables, l'injection d'épreuve, dite déchaînante, n'est suivie d'aucun trouble anaphylactique.

Plus tard, reprenant la question sur une autre base, Besredka injecte dans le péritoine d'un cobaye sensibilisé au sérum de cheval une dose non mortelle du même sérum, soit à 1/50 à 1/100 de centimètre cube ; puis, *une ou deux heures après*, dans le cerveau, une dose qui devrait le tuer sûrement, soit 1/8 de centimètre cube : le choc anaphylactique ne se produit pas.

On obtient ainsi sûrement l'*anti-anaphylaxie*, c'est-à-dire l'immunité contre les accidents anaphylactiques. Cette immunité s'établit plus ou moins rapidement suivant le point où l'on porte le produit destiné à vacciner. Chez le cobaye, elle est, en général, obtenue quatre heures après l'injection sous la peau, une à deux heures après l'injection dans le péritoine ou par la voie rachidienne; elle est parfois instantanée quand on opère par voie veineuse.

Dans les expériences précédentes, les doses employées ne permettent d'obtenir la préservation que contre une ou deux doses mortelles de sérum. Pour préserver contre un nombre plus considérable de ces dernières, Besredka a imaginé le procédé des *vaccinations subintrantes*.

Au lieu d'une seule injection de sérum dans les veines, on en pratique deux, trois, voire même quatre, à trois ou cinq minutes d'intervalle, en augmentant chaque fois la dose de sérum. Un cobaye anaphylactisé peut ainsi recevoir impunément, tout d'abord, 1/40 de centimètre cube (dose non mortelle), puis 1/10 de centimètre cube (dose deux fois mortelle, la dose mortelle étant de 1/20 de centimètre cube), puis 1/4 de centimètre cube, puis 1 centimètre cube (dose vingt fois mortelle). Besredka est arrivé ainsi à faire supporter au cobaye des doses cent ou mille fois mortelles.

Aussi recommande-t-il d'employer ce procédé en thérapeutique humaine, quand on peut craindre les accidents d'anaphylaxie sérique, surtout quand le sérum curateur doit être introduit dans la cavité rachidienne.

On peut alors injecter préventivement le sérum sous la peau, quatre heures avant l'injection thérapeutique, ou bien deux heures avant quand on opère la vaccination dans le rachis. Si on veut effectuer cette dernière par voie veineuse, Besredka conseille d'injecter 1/4 de centimètre cube, puis, dix minutes après, 1 centimètre cube, et, quinze minutes après, on peut impunément faire l'injection thérapeutique dans la cavité rachidienne.

CHAPITRE VI

STÉRILISATION

La stérilisation, c'est-à-dire la destruction des germes vivants, est une des bases de la bactériologie.

En effet, pour étudier un microbe, il faut l'obtenir à l'état de pureté et le maintenir tel ; or, les milieux qui nous entourent, de même que les objets, instruments, aliments, etc., dont le bactériologiste doit à chaque instant faire usage, sont peuplés de microbes variés. Ces microbes, il faut les tuer, sous peine de rendre toute étude impossible ; tel est le but essentiel de la stérilisation.

Les *procédés de stérilisation* les plus employés sont basés sur l'emploi de la chaleur : chaleur sèche ou chaleur humide ; dans quelques circonstances, on a recours à la filtration ; dans d'autres, aux antiseptiques.

I. — STÉRILISATION PAR LA CHALEUR SÈCHE.

Chauffage direct. — Le fil de platine, d'usage universel en bactériologie, est rapidement stérilisé par chauffage dans la flamme du bec Bunsen (fig. 24), ou toute autre flamme très chauffante ; prolonger le chauffage jusqu'au blanc (environ 1 300°).

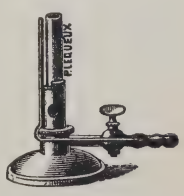

Fig. 24. — Bec Bunsen.

C'est cette propriété de supporter le rouge sans dommage qui a amené l'emploi, aujourd'hui généralisé, du fil de platine.

Si le fil est mince, il refroidit instantanément ; s'il est un peu gros, le refroidissement est plus lent ; attendre quelques secondes (plusieurs minutes avec des fils très gros) avant d'en faire usage.

Le même procédé s'applique aux palettes de platine, aux vaccinostyles, etc.

Flambage. — Certains objets lisses ; effilures de pipettes, baguettes de verre, embouchures de tubes ou de fioles, etc., sont rapidement stérilisés en passant trois ou quatre fois de suite,

lentement (comme en coupant du pain), dans une flamme très chauffante.

Le même procédé peut être utilisé pour stériliser divers instruments, en particulier l'extrémité des pinces à dissection. Il convient peu aux instruments coupants, dont il altère le tranchant.

Si l'objet est difficile à déplacer, tel un grand ballon, on peut stériliser l'orifice en promenant sur lui la flamme du bec Bunsen tenu à la main.

Flambage au four. — La plupart des objets ne peuvent être stérilisés qu'à l'aide d'appareils spéciaux : les fours à flamber.

Ces appareils sont spécialement *indiqués* pour la stérilisation des objets de verrerie (pipettes, tubes vides, fioles, boîtes de Petri, etc.) ou de porcelaine, des filtres, des instruments, etc.

Préparation des objets à stériliser. — Il ne suffit pas de stériliser les objets, il est en outre nécessaire de les préserver ultérieurement de toute souillure, et spécialement des contaminations atmosphériques. Il suffit pour cela de les fermer au préalable, avant la stérilisation, avec des substances qui laissent filtrer l'air tout en arrêtant les germes : coton ordinaire ou papier.

Fig. 25. — Bouchage d'un tube au coton.

Bouchage au coton. — Les objets à ouverture étroite, tels que tubes, flacons, fioles, sont bouchés au *coton ordinaire* (non hydrophile). On opère comme suit (fig. 25) : prendre un fragment de coton, le disposer au-dessus de l'orifice en faisant déborder largement, enfoncer le centre à l'aide d'une pointe mousse (crayon, par exemple). Le bouchon sera modérément serré : il plongera de 2 à 4 centimètres dans le récipient, suivant la hauteur de ce dernier.

Couverture de papier. — Les boîtes, verres à expérience, cristallisoirs, et tous objets à ouverture large seront enveloppés ou recouverts de papier. Le papier-filtre ordinaire est préférable, parce qu'il est moins cassant ; mais le papier d'emballage est plus économique et suffit le plus souvent.

Envelopper complètement les boîtes dans plusieurs doubles de papier.

Pour les verres (fig. 26), on se contente de les couvrir ; il est bon d'assujettir un peu les rebords à l'aide d'un tour de ficelle. Si le verre présente un ou deux becs, attention à ne pas déchirer le papier à leur niveau ; on peut utilement les protéger à l'aide d'un très léger tampon de coton.

Le plus répandu des fours à flamber est le four Pasteur.

Four Pasteur. — L'appareil est conçu d'après le principe suivant : *dans l'air ambiant, un chauffage à 170°, maintenu pendant trente minutes, suffit à détruire sûrement tous les germes.*

L'appareil (fig. 27) se compose :

D'un cylindre en tôle, à triple paroi, la moyenne moins haute : dispositif qui détermine deux espaces concentriques communiquant par le haut ;

D'un panier en toile métallique, placé dans la cavité du cylindre ;

D'un brûleur à gaz en couronne ;

Fig. 26. — Verre à pied stérilisé.

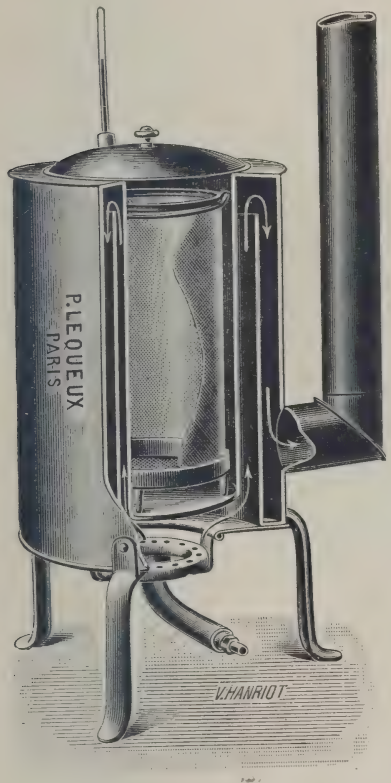

Fig. 27. — Four Pasteur.

D'un couvercle, avec douille pour le thermomètre.

Fonctionnement. — Les objets à stériliser sont desséchés complètement ; la moindre trace d'eau provoquerait la casse. On les munit ensuite de coton ou de papier, comme il a été dit.

Les introduire alors dans le panier métallique.

En raison même de la disposition du four, la température est sensiblement plus élevée au fond ; des briques, des tuiles, un support métallique quelconque, placés au fond, empêcheront le contact immédiat des objets avec la paroi inférieure, directement chauffée par le gaz.

Placer le couvercle, enfoncer le thermomètre à travers un bouchon de liège. — Allumer le gaz ; chauffer doucement, pour ne rien casser, — d'autant plus doucement que les objets sont plus épais. Une fois atteinte la température de 170°, baisser le gaz « en veilleuse » ; ouvrir ou baisser plus ou moins pour ne pas trop s'écarter du degré voulu ; éteindre après trente minutes.

Laisser refroidir complètement avant de retirer les objets n'enlever le couvercle qu'après refroidissement complet.

En enlevant le couvercle ou en retirant les objets trop hâtivement, on les exposerait à l'air frais, qui aurait tôt fait de les casser.

Contrôle de la stérilisation. — En pratique, il suffit de vérifier l'aspect du coton : il doit être légèrement roussi.

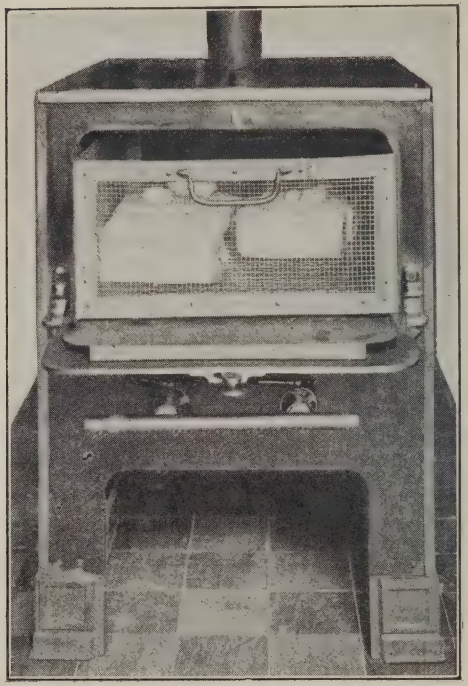

Fig. 28. — Stérilisateur de Jouan.

Quelques précautions. — *a.* Pour *allumer* le gaz, approcher d'abord du bec une flamme (allumeur à alcool, par exemple), puis ouvrir le robinet et attendre l'allumage. Si l'on ouvrait le robinet avant de présenter l'allumeur, le gaz se répandrait dans le cylindre, et le contact ultérieur de la flamme pourrait provoquer une explosion. Une fois le gaz allumé, voir si la flamme est bleue (non blanche) comme elle doit l'être; si elle est blanche, le gaz brûle en dedans : il faut alors éteindre et rallumer correctement.

b. Pour *régler* le gaz, on a souvent quelques difficultés; les mouvements de la main sont trop brusques et on éteint. Le réglage est plus facile quand on manie le robinet non avec les doigts directement, mais en le frappant à petits coups secs avec un objet pesant, clef d'autoclave ou instrument analogue.

c. Ne pas chauffer au delà du degré voulu, sans quoi le coton ou le papier se carbonisent et dégagent des produits huileux légèrement antiseptiques, qui coulent sur les récipients et les tachent.

De plus, le coton en partie détruit et le papier devenu cassant bouchent ou protègent mal leurs récipients.

d. Ne pas ouvrir le four pendant l'opération; le contact de l'air frais peut suffire à casser la verrerie.

e. Surveiller constamment la marche de l'appareil, et surtout *ne jamais abandonner l'appareil en fonctionnement.*

Stérilisateur à air de Jouan. — Pour obtenir une meilleure répartition du chauffage, et une utilisation plus complète du calorique, M. Jouan a fait construire un stérilisateur qui rappelle les fours de pâtissiers; allongé d'avant en arrière, il s'ouvre en avant pour le passage d'un tiroir grillagé dans lequel on dépose la verrerie à stériliser. M. Jouan conseille de ne mettre qu'une hauteur d'objets : tubes ou ampoules, rangés régulièrement (fig. 28).

Le stérilisateur est calorifugé, et l'air qui arrive dans la chambre de combustion, à rampes flamme bleue, est au préalable échauffé en contournant tout l'appareil; le brunissement des cotons, signe de la stérilisation, est obtenu en moins de 30 minutes.

II. — STÉRILISATION PAR LA CHALEUR HUMIDE.

Elle comporte quatre modalités différentes :

Par la vapeur d'eau sous pression; — par chauffage continu dans la vapeur à 100°; — par chauffage discontinu dans la vapeur d'eau à 100°; — par chauffage discontinu vers 56°.

Nous dirons en outre quelques mots de l'ébullition.

A. **Stérilisation par la vapeur d'eau sous pression.** — Elle est basée sur le principe suivant : *dans une atmosphère de vapeur d'eau, exempte d'air, tous les germes sont tués par exposition pendant vingt minutes à une température de 115°.*

On sait que la température d'ébullition de l'eau, et par suite la température de la vapeur d'eau produite à l'ébullition, varie suivant la pression que supporte le liquide. A la pression atmosphérique, l'eau bout à 100°. Quand la pression augmente, la température d'ébullition s'élève : elle est de 112°,2 à 1,5 atmosphère; de 121°,4 à 2 atmosphères; de 135°,1 à 3 atmosphères. On peut élever la pression en faisant bouillir l'eau dans des vases clos, basés sur le principe de la marmite de Papin.

La stérilisation sous pression est la plus couramment employée en bactériologie; elle est sûre, rapide et d'application facile.

Elle est spécialement *indiquée :*

Pour les milieux de culture (exception faite pour ceux qui ne supportent pas les températures élevées : sérum, gélatine); — pour les seringues destinées aux prélèvements ou aux injections; — pour les récipients susceptibles d'être bouchés au coton; — pour les objets en caoutchouc; — pour les cultures des microbes pathogènes, dont on veut se débarrasser, et qu'il serait dangereux d'abandonner sans stérilisation préalable.

On emploie presque toujours l'*autoclave Chamberland.*

Autoclave Chamberland. — Il se compose (fig. 29) :

D'une chaudière cylindrique A, en cuivre rouge brasé, portant à

sa partie supérieure un rebord aplati ; — d'un couvercle, fermant la chaudière, reposant sur elle par un rebord plat; entre les rebords de la chaudière et du couvercle s'interpose un anneau de caoutchouc, destiné à assurer une fermeture hermétique. Des boulons mobiles permettent d'assujettir l'un à l'autre les deux rebords. Ce couvercle porte en outre : un manomètre, indiquant la pression et la température dans l'appareil ; un robinet d'échappement d'air et de vapeur ; une soupape de sûreté ; — d'un panier en toile métallique, P, reposant par des pieds sur le fond de la chaudière ; — d'un manchon cylindrique en tôle, F, enveloppant la chaudière ; d'une ou deux couronnes de bec de gaz, placées sous la chaudière, dans l'enveloppe.

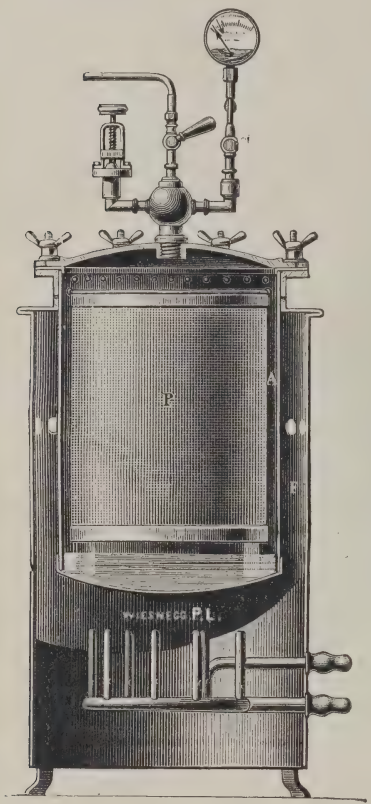

Fig. 29. — Autoclave Chamberland.

Certains appareils portent en outre une charnière ou un levier, permettant de soulever le couvercle sans l'enlever; d'autres possèdent un régulateur automatique de température.

Le gaz peut être remplacé par de fortes lampes à alcool ou à pétrole.

Préparation des objets à stériliser.— Boucher comme pour la stérilisation à sec. Il est bon de couvrir au préalable les bouchons d'un cornet de papier ou d'une compresse épaisse; sans quoi la vapeur d'eau se condense sur eux et les mouille. Dans les récipients stérilisés vides, on laissera toujours un peu d'eau. Les objets non bouchés à la ouate seront enveloppés de plusieurs doubles de papier ordinaire. — Disposer ensuite les objets dans le panier, ouverture en haut. Éviter de mettre leurs orifices au contact des parois latérales du panier, où l'eau va se condenser.

Fonctionnement. — 1° Verser dans la chaudière de l'eau en quantité suffisante. Mettre en place le panier chargé.

Le niveau de l'eau doit arriver un peu au-dessous du fond du

panier. Si l'eau encrasse (eaux calcaires), employer l'eau distillée.

2° Poser la rondelle de caoutchouc ; placer ensuite le couvercle. Serrer modérément les écrous deux à deux (les deux placés aux extrémités d'un même diamètre) à la main.

Le serrage à la clef est trop brutal ; il met rapidement hors d'usage la rondelle de caoutchouc ; il peut toujours être supprimé quand l'autoclave est confié à une seule personne. — La plupart des appareils portent deux marques (généralement O) placées l'une sur le rebord de la chaudière, l'autre sur le couvercle ; ces marques seront placées vis-à-vis l'une de l'autre. — Dans l'intervalle des stérilisations, enlever la rondelle de caoutchouc et la suspendre au mur ou à un écrou, pour éviter l'aplatissement.

3° Ouvrir le robinet d'échappement. Allumer le gaz, chauffer doucement. Pour les autoclaves petits ou moyens, il suffit d'allumer une seule couronne.

4° Surveiller le robinet. Au bout de quelques minutes, la vapeur s'échappe, d'abord en jet faible et discontinu ; plus tard, en jet continu et en sifflant. Quand le jet est nettement continu, fermer le robinet.

Pendant cette première partie du chauffage, l'air contenu dans la chaudière et dans les objets à stériliser se dilate peu à peu et s'échappe par le robinet. Il faut attendre, avant de commencer la stérilisation, que l'air soit évacué ; sans quoi l'opération s'effectuerait dans un mélange d'air et de vapeur, et les indications du manomètre seraient fausses, trop élevées, la pression de l'air venant s'adjoindre à celle de la vapeur d'eau ; la stérilisation serait inopérante. — En réalité, il reste toujours un peu d'air, mais la pratique montre que la présence de cet air résiduel n'empêche pas la stérilisation d'être efficace, si l'opération a été conduite comme il vient d'être indiqué.

Surtout ne pas faire de *décompressions*, en ouvrant brusquement le robinet du couvercle pendant la stérilisation, comme on le fait avec les étuves à désinfection ; la décompression amènerait une ébullition tumultueuse des liquides et chasserait ou au moins inonderait les bouchons.

5° Surveiller maintenant le manomètre. L'aiguille se déplace peu à peu vers la droite. Quand elle est arrivée au degré voulu (115° d'habitude), baisser la flamme en fermant plus ou moins le robinet ; régler la flamme par tâtonnement, de manière à maintenir la température à 115°.

Pour régler le gaz, voyez page 98. — Si, au début, on avait allumé deux couronnes, une seule serait maintenue allumée pour le réglage. — La flamme aura en moyenne 10 à 15 millimètres de hauteur une fois l'appareil réglé. — Éviter les courants d'air, qui éteignent facilement le brûleur.

6° Maintenir la température au degré indiqué pendant le temps nécessaire : généralement vingt minutes. Éteindre le gaz.

Ce temps est très variable. Il dépend de la nature des milieux, de leur paisseur, des récipients, etc. Les conditions indiquées (vingt minutes à 115°)

sont valables pour la plupart des milieux ordinaires en tubes : bouillon, gélose, etc., de même que pour les objets. Les milieux qui demeurent solides à température élevée, comme la pomme de terre, demandent un temps plus long ou une température plus haute (120°). Il en sera de même d'un ballon de gélose solidifiée avant stérilisation, car il faut compter le temps nécessaire à la liquéfaction. En réalité, la stérilisation commence seulement quand toute la masse a été portée à la température voulue.

7° Laisser refroidir jusqu'à ce que l'aiguille soit au zéro. A ce moment, ouvrir le robinet du couvercle pour laisser échapper la vapeur ; puis dévisser les boulons ; enlever le couvercle ; retirer les objets, les poser sur un corps mauvais conducteur de la chaleur (bois, linge, papier) pour éviter de les refroidir brusquement et de les casser. Si un peu d'eau s'est condensée sur les bouchons ou enveloppes, porter quelques heures à l'étuve pour sécher.

Ne jamais ouvrir avant la chute complète de l'aiguille, pour éviter la décompression et ses inconvénients (voy. plus haut, 4°). — Ouvrir le robinet avant de dévisser les boulons, sans quoi la vapeur filtre sous le couvercle et peut brûler l'opérateur.

Contrôle de la stérilisation. — La stérilisation étant le plus souvent confiée aux aides, il est bon de pouvoir la contrôler. On peut placer avec les objets à stériliser des substances fusibles à températures connues : soufre, antipyrine à 114° ; résorcine à 119°. Ou bien on emploiera le mélange suivant, dans lequel la coloration apparaît seulement si la fusion a eu lieu (Demandre) :

Pour 110°.	Benzonaphtol....	100 grammes.
	Safranine.....	0gr,01

Mais tous ces procédés indiquent seulement si la température voulue a été atteinte, sans préciser pendant combien de temps on l'a maintenue. Mieux vaut ajouter à chaque fournée de stérilisation un ou deux tubes de bouillon, artificiellement souillés d'une trace de terre ou de poussière (*tubes témoins*) ; on porte vingt-quatre heures à l'étuve à 37° après la stérilisation. Si cette dernière est imparfaite, les tubes donnent lieu au développement de germes, le plus souvent *B. subtilis* ou *B. mesentericus*.

Autres appareils. — A défaut d'autoclaves de bactériologie, on peut utiliser les autoclaves de chirurgie, en ayant soin toutefois de ne jamais opérer de décompression.

Pour des objets très volumineux ou pour des chargements exceptionnellement importants, on utilisera avec avantage les grandes étuves à désinfection (systèmes Geneste et Herscher, Vaillard et Besson).

B. **Stérilisation par chauffage dans la vapeur d'eau à 100°.** — Elle est peu utilisée en France, où on la réserve généralement pour la gélatine, qui supporte mal les températures plus élevées. Pour obtenir une stérilisation absolue, le chauffage à 100° doit être prolongé pendant longtemps, ou bien, — ce qui vaut mieux, — on le

répète trois jours de suite (Voy. plus loin, *Chauffage discontinu*).

Stérilisateur à vapeur d'eau à 100°. — Il est très employé en Allemagne pour la stérilisation des milieux d'usage courant, en place de l'autoclave, mais sans avantage connu sur ce dernier. Il comprend (fig. 30) : un bouilleur en cuivre D, pouvant contenir 2 à 3 litres d'eau, avec tube à niveau d'eau sur le côté.

Surmontant le bouilleur, deux cylindres concentriques, l'extérieur B ouvert en bas, l'intérieur A ouvert en haut. En dedans de A, un panier métallique P, destiné à contenir les objets à stériliser.

Un foyer de chaleur au-dessous du bouilleur.

Pour *faire fonctionner* l'appareil : Verser de l'eau dans le bouilleur; placer le panier, le cylindre, puis le thermomètre. Allumer. La vapeur passe en P, se condense sur la paroi B, et l'eau condensée tombe en CD. Quand le thermomètre atteint 100°, prolonger l'opération pendant le temps voulu, deux à trois heures pour la stérilisation en une seule séance.

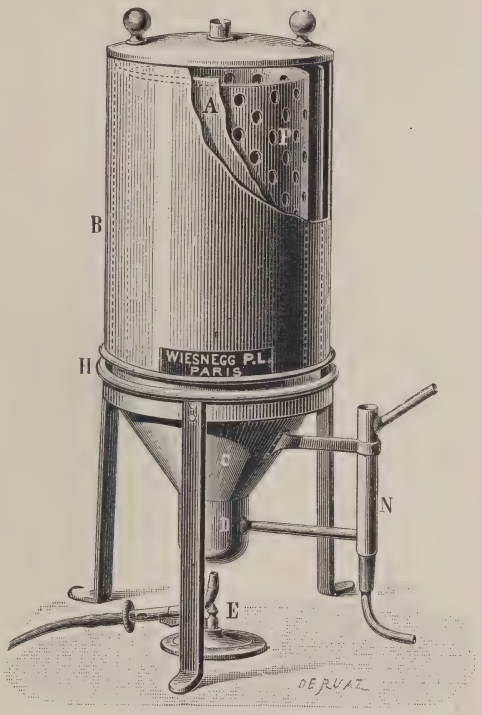

Fig. 30. — Stérilisateur à vapeur à 100°.

Les bouchons d'ouate sont très mouillés; il faut sécher à l'étuve.

C. **Stérilisation par chauffage discontinu dans la vapeur d'eau à 100°.** — Indiquée surtout pour stérilisation de la gélatine.

Principe. — Le principe est dû à Tyndall : *des bactéries qui résistent à une séance de chauffage faite dans des conditions déterminées, peuvent*

être détruites quand on répète à intervalles espacés et à plusieurs reprises la même opération.

Une infusion de foin, qui renferme toujours, on le sait, les spores très résistantes du *B. subtilis*, n'est pas stérilisée par un chauffage à 100°; mais on assure la stérilisation en répétant trois fois le même chauffage, à un jour d'intervalle. — Tyndall supposait que le premier chauffage détruit les bactéries, en respectant les spores; celles-ci germent ensuite, et un nouveau chauffage à 100° assure la destruction des bactéries nouvellement formées; une nouvelle incubation complète la germination et un troisième chauffage complète la stérilisation. Après Duclaux, on admet plutôt aujourd'hui que l'action prolongée de la chaleur modifie les spores, en les hydratant, et les rend moins résistantes.

La température de 100° est celle de la vapeur d'eau, quand l'ébullition se fait à l'air libre.

Dans tous les cas, la stérilisation comporte au moins trois séances, de trente minutes chacune en moyenne, séparées par un intervalle de vingt-quatre heures.

Application. — La stérilisation discontinue à 100° est assurée par :

L'autoclave Chamberland fonctionnant sans pression;

Le stérilisateur à vapeur à 100° (Voy. plus haut);

Ou simplement un appareil improvisé, comportant une bassine d'eau, surmontée d'un cylindre disposé pour recevoir les objets, et chauffée par une forte flamme.

Fonctionnement de l'autoclave comme appareil à vapeur sans pression (à 100°). — Nous connaissons déjà l'autoclave.

On effectuera les temps 1° à 4° ci-dessus (p. 100); mais à la fin du temps 4°, on laissera le robinet ouvert; l'aiguille du manomètre restera au zéro, la vapeur sera à 100°. Baisser ensuite le gaz de manière à obtenir un dégagement de vapeur continu, mais léger. Maintenir le temps voulu, au plus trente à quarante minutes; au bout de ce temps, il ne reste plus guère d'eau dans la chaudière. Éteindre, ouvrir l'appareil, traiter les objets comme ci-dessus.

D. **Stérilisation par chauffage discontinu vers 56°.** — Elle est indiquée spécialement pour le sérum sanguin, quand il n'a pu être recueilli aseptiquement.

Le sérum se coagule (ou se solidifie) vers 65°-68°. Il faut le stériliser à une température nettement inférieure, 56° à 57°.

Principe de la méthode. — Voyez ci-dessus C.

Préparation du liquide à stériliser. — Le liquide devant être plongé dans l'eau sera placé en récipients scellés. On emploie généralement des ballons à long col, scellés après remplissage.

L'appareil ordinairement utilisé est le bain-marie à régulateur automatique de d'Arsonval.

Bain-marie à stérilisation de sérum. — L'appareil (fig. 31) se compose d'une chaudière en cuivre, A, communiquant latéralement avec un cylindre plus petit, C, muni d'un régulateur métallique de Roux, R (p. 145) ; dans le réservoir, un panier métallique, D, fermé en haut par un disque grillagé, E, mobile sur un axe médian. Couvercle avec thermomètre ; brûleur à gaz et conduite de gaz.

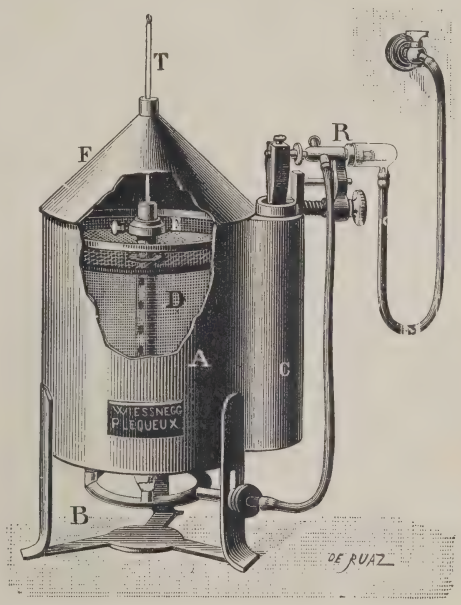

Fig. 31. — Bain-marie à stérilisation de sérum.

Pour le fonctionnement : remplir d'eau aux trois quarts le réservoir ; placer les ballons (scellés à la lampe) remplis de sérum, les tenir immergés à l'aide du disque. Placer le couvercle, allumer le gaz ; surveiller le thermomètre. Quand la température atteint 58°, régler le régulateur pour cette température (Voy. p. 145) le maniement du régulateur) ; maintenir pendant une heure.

Laisser les ballons dans le bain-marie ; recommencer la même opération le lendemain, et ainsi de suite pendant sept jours.

L'appareil est réglé une fois pour toutes à la température voulue. Il suffit de surveiller de temps à autre son fonctionnement.

Nous avons supposé qu'on stérilisait le sérum en ballons. On peut également le stériliser en tubes ; dans ce cas, verser l'eau de manière que son niveau supérieur demeure assez loin des bouchons des tubes. Protéger les bouchons par plusieurs doubles de papier.

Ce procédé n'est guère valable que pour le sérum, peu favorable à la culture des saprophytes. Il serait insuffisant dans la plupart des autres cas.

E. Ébullition. — L'ébullition dans l'eau ordinaire assure mal une stérilisation absolue. En effet, d'après Miquel et Lafraye, il faudrait

cinq heures d'ébullition pour tuer toutes les spores du *B. subtilis*, saprophyte extrêmement répandu.

Néanmoins l'ébullition est suffisante pour désinfecter; trente minutes d'ébullition suffisent à détruire presque tous les microbes pathogènes. Seules persistent quelques spores, très résistantes. Aussi l'ébullition est-elle utilisable dans quelques cas :

Pour tuer des cultures de microbes pathogènes non sporulés, qu'il serait imprudent d'abandonner au hasard dans un laboratoire; pour désinfecter les instruments qui doivent servir à une opération aseptique de laboratoire.

Une pratique simple consiste à disposer chaque matin un vase métallique assez large, renfermant de l'eau, pour y jeter au cours des manipulations les objets souillés hors d'usage (pipettes après prélèvements, tubes ou ballons de culture) de même que les instruments ayant servi à des prélèvements de produits pathologiques; on fait bouillir quelques minutes le soir, ou plus souvent si besoin.

On peut élever la température d'ébullition en ajoutant à l'eau certaines substances; en solution saturée, le carbonate de soude élève le point d'ébullition à 104°,6, le carbonate de potasse à 135°. Pasteur se servait d'un bain-marie à chlorure de calcium (104°).

III. — STÉRILISATION PAR FILTRATION.

Dans certaines circonstances, on opère la stérilisation à travers des filtres, susceptibles de laisser passer les liquides en arrêtant les germes.

Principales indications : stérilisation de l'eau (on doit toujours posséder de l'eau stérile dans les laboratoires); — stérilisation des milieux liquides qui supportent mal la chaleur (sérum sanguin, sérosité d'ascite, bouillon lactosé) ; — séparation des microbes contenus dans un milieu de culture liquide, dans le but de débarrasser cette culture des corps microbiens. Il est bon de savoir que les filtres arrêtent une certaine quantité de substances organiques et albuminoïdes ; le liquide filtré peut donc différer sensiblement du liquide originel.

Pour la stérilisation, on s'adresse aux bougies filtrantes.

Règles générales. — a. *Les bougies, les raccords, etc., seront toujours stérilisés au préalable.*

b. *Les liquides filtrés seront recueillis aseptiquement dans des vases stériles.*

c. *Quand le liquide à filtrer est septique, l'appareil et la bougie seront stérilisés sitôt après usage.*

Les bougies filtrantes. — Les plus usitées sont les bougies Chamberland et les bougies Berkefeld.

Les ***bougies Chamberland*** (fig. 32) sont en pâte de porcelaine dégourdie. Il en existe plusieurs modèles : le plus répandu est constitué par un cylindre de porcelaine dégourdie, épais de 3 à 4 millimètres en moyenne ; fermé à une extrémité, le cylindre est ouvert à l'autre extrémité par une tétine en porcelaine émaillée, reliée au corps de la bougie par un anneau de même substance. Ce modèle comporte deux types différents, B et F ; la pâte de la bougie B est plus compacte et par suite se laisse traverser plus difficilement ; cette bougie convient aux filtrations de liquides non albumineux sous pression de plusieurs atmosphères, alors que la bougie F, plus perméable, est indiquée pour les filtrations par aspiration, ou sous pression faible, et pour les liquides albumineux.

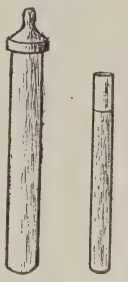

Fig. 32. — Bougies Chamberland.

Il existe en outre, pour l'usage des laboratoires, d'autres *bougies de laboratoire*, plus petites que les précédentes, en forme de cylindre, ouvert à un bout, sans tétine.

Les ***bougies Berkefeld*** sont constituées par de la terre d'infusoires. Il en existe des modèles très variés ; la plupart ont la forme des bougies Chamberland, la tétine étant remplacée par un tube métallique creux, soudé à la bougie par un ciment. Quelques modèles très petits, à marque variable suivant leur perméabilité, sont spécialement construits pour les laboratoires.

En dehors des précédentes, il existe d'autres bonnes bougies filtrantes : *bougie Garros*, en porcelaine d'amiante ; *bougie Mallié*, analogue à la bougie Chamberland.

Il est bon de connaître les *avantages* et les *inconvénients* des bougies les plus employées.

La bougie Chamberland est solide, à peu près inusable, supporte bien les stérilisations et régénérations ; elle est de plus peu coûteuse. Mais son débit est faible si la pression n'est pas élevée.

La bougie Berkefeld présente un débit plus considérable et filtre assez vite même sans pression, mais elle est onéreuse, extrêmement fragile, s'use vite, supporte mal la plupart des procédés de régénération et de stérilisation.

Dans tous les cas où elle peut être employée, la bougie Chamberland est préférable.

Vérification des bougies. — Il peut arriver qu'une bougie, même neuve, présente des solutions de continuité minimes, imperceptibles à l'œil nu;

au niveau de ces solutions, le liquide passerait sans filtrer, et la filtration serait inopérante. Aussi est-il nécessaire de vérifier l'étanchéité des bougies avant l'emploi, soit à l'état neuf, soit quand elles ont été soumises à l'action de la chaleur sèche.

Pour vérifier les bougies, on procède comme suit (fig. 33) : Adapter à la tétine un tube de caoutchouc; à l'autre extrémité de ce dernier, adapter un appareil à compression : pompe de Potain, poire de Richardson ; plonger la bougie dans un récipient plein d'eau. Comprimer l'air dans la bougie, en manœuvrant la pompe ou la poire ; surveiller le récipient. Si la bougie est fêlée, des bulles d'air se dégagent et montent à la surface. *Une bougie fêlée est inutilisable.*

Fig. 33. — Vérification d'une bougie filtrante.

Pour certaines bougies de laboratoire, sans tétine, on modifie un peu l'expérience : introduire dans la cavité de la bougie un bouchon en caoutchouc, entrant à frottement, et traversé par un tube de verre creux débordant des deux côtés; relier le tube de verre à un appareil à compression, et opérer ensuite comme ci-dessus.

Entretien des bougies. — Même quand elles filtrent de l'eau claire, les bougies se colmatent; les particules solides forment boue à la surface externe, d'autres obstruent les pores plus ou moins profondément (*encrassement*) ; on constate l'encrassement par la diminution du débit. La rapidité d'encrassement varie beaucoup suivant la qualité de l'eau et suivant la vitesse de filtration ; en moyenne, il faut nettoyer les bougies (en surface) tous les deux ou trois jours, les régénérer (en profondeur) tous les dix jours. Les mêmes opérations devront être faites chaque fois que la bougie aura filtré un liquide nutritif quelconque (bouillon, sérum).

Pour *nettoyer* les bougies : les brosser à grande eau. On peut brosser durement les bougies Chamberland ; il faut brosser doucement les bougies Berkefeld.

Pour *régénérer les bougies Chamberland*, le mieux est de les porter à haute température, de préférence au four à moufle, sinon dans la flamme du bec Bunsen ou du chalumeau; ces procédés régénèrent très bien, le premier surtout, mais ils exposent beaucoup aux fêlures. On évitera généralement ces dernières, en séchant soigneusement les bougies à l'étuve avant de les soumettre à la régénération. Toute bougie régénérée par la chaleur sera vérifiée au point de vue étanchéité. — On peut s'adresser aux procédés chimiques : *a.* plonger les bougies pendant quelques heures, tétine surnageant, dans une solution de permanganate de potasse à 1 p. 100, puis dans une solution d'hyposulfite de soude à 5 p. 100; enfin laisser séjourner dans une grande bassine d'eau, pour enlever l'hyposulfite; *b.* on gagne du temps en procédant par aspiration (Voy. ci-dessous) : faire passer d'abord du permanganate, puis du bisulfite, puis de

l'eau distillée ; *c.* plonger vingt-quatre heures, tétine surnageant, dans l'acide chlorhydrique au tiers ; rincer ensuite en laissant quelques heures dans l'eau.

La *régénération des bougies Berkefeld* est beaucoup plus délicate. On peut y faire passer, après brossage, une solution de carbonate de soude ou de l'eau ammoniacale (Nicolle et Remlinger).

Stérilisation des bougies. — Elle sera faite de préférence à l'autoclave ; humecter la paroi, boucher au coton, envelopper de papier. — La bougie Chamberland se stérilise également bien au four Pasteur ; sécher au préalable. — Pour désinfection (après filtration des liquides septiques), le chauffage dans l'eau bouillante pendant trente minutes suffit généralement. Placer les bougies dans l'eau froide, qu'on portera peu à peu à l'ébullition.

Appareils de filtration. — Ils sont très nombreux. Nous signalerons seulement les plus couramment employés.

La filtration peut être faite *par aspiration* (c'est-à-dire sous la pression atmosphérique) ou *sous pression.*

Par aspiration. — C'est le mode d'emploi le plus fréquent.

Appareil improvisé. — Quand la quantité du liquide à filtrer est assez grande (100 centimètres cubes au moins), il est facile d'improviser un appareil (fig. 34).

Disposition. — Employer un flacon à ouverture assez large, fermer avec un bouchon en caoutchouc à deux trous, traversés chacun par un tube coudé à angle droit; l'un des tubes EE′ plonge dans le flacon (tube d'écoulement), l'autre dépasse à peine sous le bouchon (tube d'aspiration); ce dernier est muni d'un tampon de coton un peu serré, entre deux étranglements.

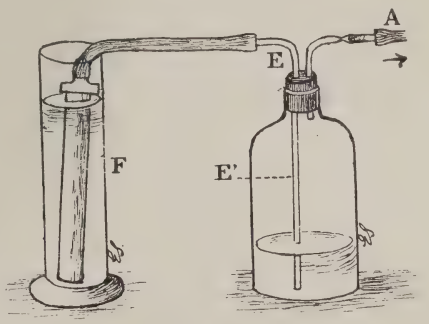

Fig. 34. — Appareil improvisé pour filtration.

Prendre d'autre part un tube en caoutchouc épais ; adapter une extrémité à la tétine de la bougie F, l'autre extrémité au tube d'écoulement ; serrer les deux ajutages au fil fort ou au fil métallique. Stériliser le tout à l'autoclave, largement entouré de papier.

Fonctionnement. — 1° Développer l'appareil refroidi. Verser le liquide à filtrer dans une éprouvette large. Placer la bougie dans l'éprouvette, en faisant déborder la tétine.

2° Relier le tube d'aspiration A à un appareil d'aspiration, généralement trompe à eau ; on peut utiliser la pompe de Potain. Le

s l'ensemble de l'appareil, et le liquide filtre à travers coule dans le flacon seulement après quelque temps, a été remplie. Ajouter de temps à autre le liquide prouvette.

uantité de filtrat est suffisante, arrêter la trompe à caoutchouc du tube d'aspiration ; l'air rentre en sifflant, mais filtré par le tampon de coton.

4° Avec les précautions d'asepsie habituelles, enlever le bouchon : le remplacer par un tampon de coton (stérilisé au préalable) ou par un bouchon de flacon répartiteur (p. 141).

Si le liquide est rare ou précieux, recueillir à la pipette le filtrat qui remplit la cavité de la bougie (environ 50 à 75 centimètres cubes pour la bougie Chamberland) ; transvaser aseptiquement.

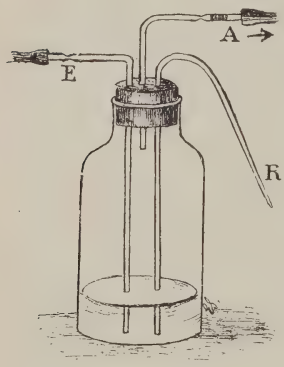

Fig. 35. — Dispositif à double usage pour filtration.

Le flacon sera toujours en verre épais. Les récipients à paroi mince se brisent souvent sous l'effort de la pression atmosphérique.

On pourrait se servir d'un flacon à deux tubulures.

Répartition du liquide stérile. — Voyez, page 141, *l'usage des matras ou flacons répartiteurs.*

Dispositif a double usage. — On peut d'emblée disposer l'appareil (fig. 35) de manière à permettre d'abord la filtration, puis la répartition, sans avoir besoin de changer les bouchons : dans ce but, on ferme avec un bouchon à trois trous (ou on emploie un flacon à trois tubulures), donnant passage à trois tubes : deux disposés comme ci-dessus (écoulement et aspiration) ; le troisième, R, tube de répartition, plonge presque au fond et se termine à l'extérieur par une branche à angle aigu, effilée à l'extrémité, fermée. La filtration terminée, on condamne le tube d'écoulement en scellant à la lampe. La disposition du flacon est alors celle du flacon répartiteur, que nous retrouverons plus loin (p. 141).

Appareils spéciaux. — La description précédente nous permettra d'être brefs sur les appareils construits spécialement.

Le mode d'emploi du filtre Martin (fig. 36) est facile à comprendre d'après la figure. La bougie Chamberland, contenue dans une armature Chamberland (Voy. plus loin : *Filtration de l'eau*) commu-

nique par un tube de caoutchouc épais, E, avec un ballon à trois tubulures, C ; un entonnoir métallique, D, est vissé sur le fond de l'armature. La tubulure supérieure du ballon est mise en communication avec l'appareil à aspiration; le liquide, versé dans l'entonnoir, traverse la bougie de dehors en dedans. Après filtration, le liquide peut être réparti à l'aide de la tubulure latérale, dont on cassera la pointe. Ce modèle a l'avantage d'être facilement stérilisable et de permettre une filtration continue.

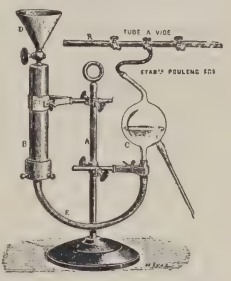

Fig. 36. — Appareil à filtration de Martin.

L'appareil de Chamberland est analogue au modèle d'appareil improvisé décrit ci-dessus, le flacon à trois tubulures étant remplacé par un ballon à trois effilures.

Filtration de petites quantités de liquide. — Pour de petites quantités, il est plus avantageux d'avoir recours à des appareils qui retiennent le moins possible de liquide. On emploiera dans ce but :

a. Le filtre de Kitasato (fig. 37). — Simple modification de la carafe à filtrer de Duclaux : flacon conique avec tubulure latérale pour l'aspiration ; le bouchon en caoutchouc, à trou large, porte à son extrémité inférieure une bougie, à son extrémité supérieure un bouchon plus petit, traversé par l'extrémité d'un entonnoir en verre.

Fig. 37. — Filtre de Kitasato.

Cet entonnoir n'est pas indispensable : on peut verser directement le liquide à filtrer dans la bougie, à la pipette. Toute bougie sans tête peut être utilisée (modèles Chamberland ou autres). Remarquer que la filtration se fait ici de dedans en dehors ; l'encrassement intéresse surtout la paroi interne; il est alors très difficile de nettoyer la bougie, il faut la régénérer (Voy. plus haut). Ne pas oublier de munir la tubulure latérale d'un tampon de coton un peu serré.

b. L'appareil dit pour « essais de Martin » (fig. 38). — Il comprend une bougie de laboratoire, A, fermée en haut par un bouchon à un trou et suspendue dans un tube à essai, B ; le tout est placé à l'intérieur d'un large cylindre en verre, C, portant une tubulure latérale, D,

pour l'aspiration, et fermé par un bouchon à un trou. L'effilure d'un entonnoir traverse les deux bouchons et débouche dans la cavité de la bougie. En faisant le vide, le liquide versé dans l'entonnoir filtre de dedans en dehors et vient se collecter dans le tube à essai. Appareil très pratique, facilement stérilisable en totalité.

c. L'appareil a filtration de Jouan (fig. 39). Également très commode. Le corps, B, d'une bougie Chamberland, est encastré par la

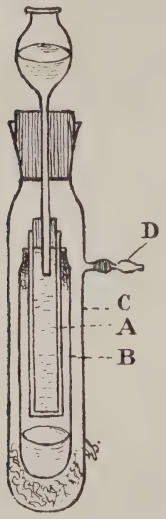

Fig. 38. — Filtre dit pour essais de Martin.

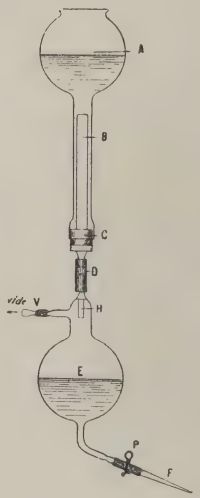

Fig. 39. — Appareil à filtration (Jouan).

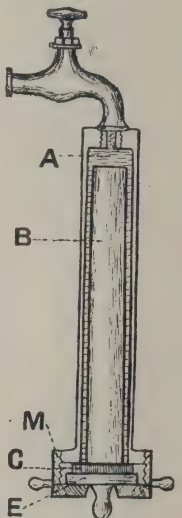

Fig. 40. — Filtration de l'eau.

bague C dans l'entonnoir à boule A. La tétine est reliée par le raccord O à la tubulure supérieure H d'une ampoule à trois tubulures E; les deux autres tubulures servent, l'une V à faire le vide ; l'autre F, commandée par la pince P, à répartir le liquide filtré.

Filtration sous pression. — Son application habituelle est la filtration de l'eau. La filtration des liquides visqueux, un peu lente quand on emploie l'aspiration, est facilitée par l'emploi d'un appareil à compression (appareil Chamberland).

Filtration de l'eau. — Pour filtrer l'eau, on peut s'adresser à l'une des bougies filtrantes signalées plus haut. Nous parlerons seulement du filtre Chamberland, le plus employé (fig. 40).

La bougie, B, portant un anneau de caoutchouc, C, qui vient se superposer à l'embase de la tétine, E, est disposée tétine en

bas dans un cylindre métallique. Ce cylindre porte à une extrémité un pas de vis, qui s'emboîte exactement sur un robinet de canalisation (robinet spécialement construit pour cet usage) ; l'autre extrémité, ouverte, porte à l'extérieur un autre pas de vis. Sur ce dernier, on visse une bague métallique à écrou, M, perforée pour laisser passer la tétine. En serrant fortement la bague, on comprime l'anneau de caoutchouc, qui fait joint hermétique.

Ouvrons le robinet : l'eau passe entre l'armature et la bougie, puis filtre à travers la bougie sous l'influence de la pression de la canalisation et s'échappe par la tétine.

Appareil Chamberland pour filtration par compression. — Cet appareil comporte (fig. 41) :

Une bougie Chamberland, avec la même armature qui vient d'être décrite pour filtration de l'eau. Le pas de vis supérieur s'adapte à l'extrémité inférieure d'un réservoir cylindrique.

Le réservoir, cylindrique, fermé en haut par un couvercle à rondelle de caoutchouc et à écrous (comme l'autoclave). Le couvercle est muni d'un orifice pour le manomètre et d'un autre relié à un appareil de compression ;

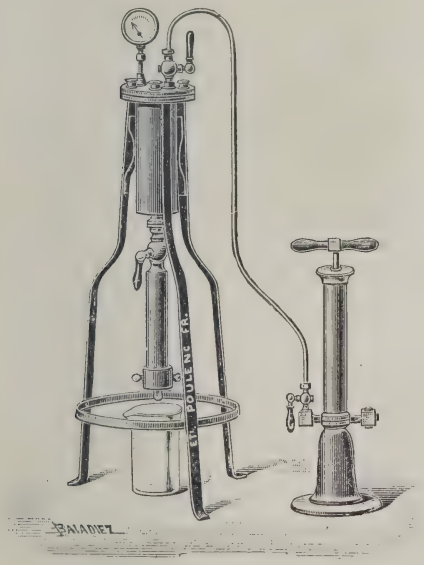

Fig. 41. — Appareil Chamberland pour filtration par compression.

Fig. 42. — Dispositif pour recueillir les filtrats.

Un tube métallique à robinet, reliant le réservoir à l'armature; ne pompe reliée au réservoir par un tube ; un support.

Le liquide filtré doit être recueilli stérilement. Entre autres procédés, on peut recommander les deux suivants :

a. Adapter à la tétine un tube de caoutchouc muni d'un tube de verre ; insinuer le tube de verre entre le goulot et le bouchon de coton d'un flacon stérilisé placé sous la bougie (fig. 42).

b. Adapter à la tétine un tube de caoutchouc ; le relier à un flacon à trois tubulures, ballon de l'appareil Martin à aspiration, ou flacon improvisé de la figure 35.

Pour stériliser, il est bon de mettre à l'autoclave la bougie (avec la bague de l'armature et sa rondelle de caoutchouc) adaptée au flacon récepteur.

Fonctionnement. — Adapter la bougie dans l'armature, comme pour la filtration de l'eau ; visser l'armature au tube de raccord ; ouvrir le robinet de ce dernier. Verser le liquide à filtrer dans le réservoir sans remplir. Adapter le couvercle. Faire compression jusqu'à ce que le manomètre marque 2 ou 3 atmosphères ; fermer le robinet. Maintenir la pression à ce niveau en comprimant de temps à autre. Le liquide sous pression filtre à travers la bougie et passe dans le flacon récepteur.

L'opération terminée, fermer le robinet, attendre que le liquide cesse de couler dans le flacon récepteur.

Pour séparer le flacon récepteur, la manœuvre est facile si on a employé un flacon à 3 tubulures : sceller l'étranglement à la lampe. S'est-on servi d'un flacon ordinaire : enlever le bouchon, retirer le tube de verre sans mouiller la paroi, replacer le bouchon, le tout stérilement et très vite.

IV. — STÉRILISATION PAR LES ANTISEPTIQUES.

Elle occupe en bactériologie une place modeste. Les antiseptiques peuvent être employés :

1° Pour désinfecter les téguments. C'est l'antisepsie chirurgicale, qui ne présente ici rien de particulier.

2° Pour désinfecter les instruments, comme en chirurgie : la stérilisation par la chaleur est préférable.

3° Pour stériliser des récipients peu accessibles aux modes habituels de stérilisation : cloches par exemple. On lave alors les parois avec un antiseptique non volatil (sublimé à 1 p. 1 000).

4° Pour maintenir stériles certaines substances thérapeutiques : sérums antitoxiques, vaccins bactériens (addition de phénol, acide hymique, camphre, tricrésol).

5° Pour stériliser certains microbes sans altérer sensiblement leurs cultures. On emploiera alors des antiseptiques volatils, susceptibles

d'être éliminés après avoir agi, comme l'a indiqué E. Roux (éther, chloroforme, essences d'ail, de moutarde).

6° Pour stériliser les cultures qu'on ne veut pas conserver vivantes: tous les antiseptiques sont utilisables.

7° Pour fixer des cultures à un stade donné, sans leur permettre de pousser davantage (pour collections, par exemple) : les vapeurs de formol suffisent.

CHAPITRE VII

MILIEUX DE CULTURE

Les microbes, pour se développer, ont besoin d'aliments. Dans les laboratoires, ces aliments leur sont fournis par nos milieux nutritifs, ou milieux de culture.

Les milieux de culture sont très nombreux. Certains peuvent être utilisés pour la plupart des espèces : nous les étudierons dans ce chapitre. Les milieux spéciaux à tel ou tel microbe seront décrits avec ce microbe (Voy. *Bactériologie spéciale*).

Classification. — *a.* Nous étudierons les *milieux non albumineux* et les *milieux albumineux*, — suivant l'absence ou la présence d'une albumine coagulable par la chaleur. Le mode d'obtention et de stérilisation de ces deux catégories de milieux est, en effet, essentiellement différent.

b. Les uns et les autres comprennent des milieux *liquides* et des milieux *solides*. — Toutefois, cette distinction n'est utile que pour les milieux non albumineux. Les milieux albumineux solides les plus habituels ne diffèrent en effet des milieux liquides que par leur état physique, non par leur composition.

c. Les milieux albumineux peuvent être employés tels quels (*milieux albumineux purs*), ou additionnés d'autres substances (*milieux albumineux composés*).

d. La plupart des milieux non albumineux sont *artificiels* ; quelques-uns seulement sont *naturels*, c'est-à-dire employés tels qu'ils existent dans la nature.

Au contraire, tous les milieux albumineux purs sont *naturels*.

Nous étudierons les milieux de culture dans l'ordre suivant :

I. — *Milieux non albumineux liquides.* { artificiels. { animaux. / végétaux. / définis. } / naturels. }

II. — *Milieux non albumineux solides.* { artificiels. / naturels. }

III. — *Milieux albumineux purs.*

IV. — *Milieux albumineux composés.*

Répartition des milieux de culture. — Une fois préparés, les milieux de culture sont *répartis* dans des récipients, variables suivant leur destination, et qui seront indiqués en temps utile, spécialement aux chapitres IX et X. Pour le moment, nous supposons que la répartition est toujours faite en tubes à essais.

PRÉPARATION

I. — MILIEUX NON ALBUMINEUX LIQUIDES

Milieux artificiels

Pour la clarté de l'exposition, il est commode de distinguer les milieux *animaux*, les milieux *végétaux* et les milieux *à composition chimique définie*.

Milieux animaux. — Le plus important, de beaucoup, est le bouillon peptoné salé, généralement appelé « bouillon » purement et simplement ; il est journellement employé dans tous les laboratoires.

Bouillon peptoné salé (bouillon ordinaire). — On le prépare habituellement de la manière suivante :

a. Prendre 500 grammes de viande, débarrassée des os, tendons, aponévroses et de la graisse. Hacher finement, à l'aide du hachoir ou d'un hache-viande.

b. Mélanger avec 1 000 grammes d'eau. Laisser macérer à froid (glacière en été) pendant douze heures. — Si l'on est pressé, faire macérer à chaud (50° à 55°), une demi-heure.

c. Porter ensuite sur le feu. Amener lentement à l'ébullition et faire bouillir à feu doux pendant dix minutes, en agitant constamment. Cette opération a pour but de coaguler les albuminoïdes.

d. Verser le mélange sur un linge propre, blanc ; exprimer fortement et recueillir le liquide dans une marmite émaillée.

e. Ajouter, pour 1 000 grammes :

Peptone.....	20 grammes.
Chlorure de sodium.....	5 —

Faire dissoudre à feu doux en agitant constamment.

On recommande souvent d'ajouter également 1 gramme de phosphate de soude.

f. Passer sur filtre Chardin mouillé (pour arrêter les graisses), sur un entonnoir en verre.

g. Alcaliniser légèrement. Pour cela, verser petit à petit une solu-

tion de soude pure au dixième, en vérifiant sans cesse la réaction au papier de tournesol. Quand les deux papiers rouge et bleu ne virent plus, ajouter encore un peu de soude, de manière à obtenir une réaction légèrement alcaline. — L'alcalinisation est le temps le plus délicat. Ne pas la confier aux aides, à moins qu'ils ne soient très exercés.

On peut employer, au lieu de soude, le carbonate de soude.

h. Porter à l'autoclave, en boîte à lait (sinon en ballon ou matras); chauffer à 117° pendant quinze minutes.

Ce premier chauffage précipite les phosphates terreux, qui troublent le milieu. Couvrir le récipient pour le chauffage.

i. Au sortir de l'autoclave, filtrer à nouveau sur papier Chardin. Recueillir dans des ballons ou vases à précipiter.

Ramener à 1 000 centimètres cubes par addition d'eau distillée.

j. Répartir en tubes ou ballons, boucher, stériliser.

k. La *stérilisation* sera faite à 115° pendant vingt minutes. Prendre garde de ne pas dépasser la température atteinte pendant le temps *h*, sans quoi le bouillon se troublerait à nouveau.

Le milieu obtenu doit être clair, jaune brunâtre.

Bouillons de cheval, de veau, de poule, etc. — Ils se préparent exactement de la même manière que le précédent, en substituant à la viande de bœuf respectivement les viandes de cheval, de veau ou de poule.

Le bouillon de cheval est souvent utilisé parce que la viande de cheval coûte généralement moins cher que toute autre. Ce bouillon est plus riche que les autres en sucre ; si on veut l'utiliser pour préparation des milieux sucrés, il faut le désucrer au préalable (Voy. plus loin, *Bouillon Martin*).

Bouillons de viscères. — Ils sont fabriqués comme le bouillon ordinaire, en substituant à la viande des viscères hachés : foie, rate, muqueuse intestinale, etc. ; ces bouillons demeurent presque toujours opalescents.

Bouillon aux extraits de viande. — Très employé à l'étranger il a l'avantage d'être rapidement prêt, mais sa valeur nutritive est généralement moindre que celle du bouillon ordinaire ; sa teneur en sel est parfois assez élevée (il est toujours facile de s'en assurer). L'*extrait Liebig* est le plus utilisé.

Peser 5 grammes d'extrait, faire dissoudre à chaud dans 1 litre d'eau. Vérifier la réaction, alcaliniser si besoin. Chauffer cinq minutes à 117°. Passer à chaud sur filtre épais mouillé. Répartir et stériliser à 115°.

Il est bon d'ajouter, au premier temps, peptone et sel marin.

Toutes les substances animales se prêtent à la fabrication des bouillons, sur les mêmes bases que ci-dessus : poissons, moules, etc. Usage restreint.

Bouillons sucrés. — Ajouter au bouillon ordinaire 2 p. 100 de sucre : *glucose*, *lactose*, *dulcite*, *mannite*, etc.

L'addition pourra être faite pendant la fabrication des bouillons, au temps *i*, ou bien on ajoutera le sucre au bouillon tout préparé.

Pour des recherches précises, il faut d'abord faire disparaître les sucres normalement contenus dans la viande. On peut se contenter de laisser la viande à macérer à 37° (au lieu de faire macérer à froid), ou bien ensemencer le filtrat d'une culture de colibacilles typiques et mettre quelques heures à l'étuve.

Bouillon glycériné. — Préparer comme les précédents, en substituant aux sucres 6 p. 100 de glycérine neutre.

Bouillons sucrés carbonatés. — Répartir en tubes le bouillon sucré ; ajouter à chaque tube une pincée de carbonate de chaux. Boucher et stériliser.

On emploie surtout les bouillons carbonatés, *lactosé* et *glucosé*.

Eau peptonée. — Pour 1 000 grammes d'eau, ajouter :

Peptone.....	10 grammes.
Sel marin.....	5 —

On emploie généralement les peptones Chapoteaut ou Defresne.

Faire dissoudre à feu doux, en agitant. Porter à l'ébullition.

Répartir et stériliser à l'autoclave.

L'alcalinisation est en général inutile, le milieu étant un peu alcalin, mais il est toujours prudent de vérifier.

Voyez, pour d'autres solutions peptonées, *Vibrion cholérique*, *Colibacille* et *Bacille typhique*.

Bouillon Martin. — Primitivement destiné à l'obtention de la toxine du bacille diphtérique, il est aujourd'hui couramment employé pour un grand nombre d'autres germes, spécialement en vue d'étudier les toxines.

On prépare d'abord une solution de peptone et une macération de viande.

Préparation de la solution de peptone. — 1° Prendre cinq estomacs de porcs, laver, hacher finement muqueuse et musculeuse ;

2° Faire le mélange suivant :

Estomac de porc haché.....	200 grammes.
HCl à 16° B.....	10 centimètres cubes.
Eau à 50°.....	1 000 — —

Il n'y a aucun inconvénient à ajouter de la viande, ou des fragments de viscères ; la valeur nutritive est plus grande.

3° Placer douze à vingt-quatre heures à 50°. La pepsine (provenant de la muqueuse stomacale) digère plus activement à cette température.

4° Chauffer à 100° (pour détruire la pepsine). Passer sur tamis ou sur coton hydrophile.

5° Alcaliniser à 80° environ ; filtrer sur papier-filtre.

Préparation de la macération de viande. — 1° Hacher 500 grammes de viande, mélanger à 1 litre d'eau.

2° Chauffer à 37° et maintenir vingt heures à l'étuve à 37°.

A 37°, la viande fermente légèrement, et les sucres sont détruits : le bouillon est désucré.

3° Exprimer, recueillir le liquide.

4° Ajouter 5 grammes de sel marin.

Mélange. — 1° Mélanger à parties égales la solution de peptone et la macération de viande, préparée comme il vient d'être dit. Chauffer à 70°.

2° Filtrer sur papier Chardin. Neutraliser exactement, à la soude.

3° Le liquide étant neutre au tournesol, ajouter, par litre, 7 centimètres cubes de solution normale de soude (à 40 p. 1000).

4° Porter à l'autoclave à 117° pendant quinze minutes. Filtrer au sortir de l'autoclave.

5° Répartir, stériliser à 115°.

Il est parfois préférable de stériliser par filtration sur bougie après le temps 3.

Macération de viande. — Rarement employée aujourd'hui.

Faire macérer à froid, pendant douze heures, 500 grammes de viande dans 1 litre d'eau. Exprimer, filtrer sur papier-filtre épais.

Ajouter 0,5 p. 100 de sel marin. Chauffer doucement à 60°. Stériliser par filtration.

Milieux végétaux. — Ils sont peu utilisés, leurs qualités nutritives étant généralement assez faibles. Principales préparations :

Infusion de foin et de paille. — Hacher 15 à 20 grammes de foin ou de paille, laisser macérer deux heures dans 1 litre d'eau. Faire bouillir quelques minutes. Filtrer. Répartir. Stériliser.

Infusion de pommes de terre ou de carottes. — Râper pommes de terre ou carottes. Faire macérer 10 à 20 grammes de pulpe dans 500 grammes d'eau, pendant deux heures. Exprimer sur un linge. Faire bouillir. Filtrer sur papier. Répartir. Stériliser à l'autoclave.

Eau de malt. — A 100 grammes d'eau, ajouter 10 grammes d'orge germée, préalablement broyée. Chauffer une heure à 55°-58°; la diastase transforme l'amidon en maltose (ne pas dépasser 58°, pour ne pas détruire la diastase). Faire bouillir quelques minutes. Filtrer. Répartir. Stériliser à l'autoclave.

Infusions de touraillons. — A 100 grammes d'eau, ajouter

5 grammes de touraillons (plantule d'orge germée). Le reste de la préparation, comme pour l'eau de malt.

Eau de levure. — Délayer la levure dans dix fois son poids d'eau. Faire bouillir en agitant. Filtrer, répartir et stériliser.

Bouillon de haricots. — Incorporer à 1 litre d'eau 50 à 60 grammes de haricots blancs. Faire macérer quelques heures. Porter à l'ébullition, maintenir pendant trente minutes. Passer sur tamis. Ajouter 2 p. 100 de saccharose, 1 p. 100 de sel marin et un peu (traces) de bicarbonate de soude. Filtrer. Répartir. Stériliser.

Milieux chimiquement définis. — Les milieux d'usage courant, issus de la viande, des végétaux, des produits organiques ont une constitution complexe : leur formule chimique est ignorée. Dans le but d'étudier de plus près la biologie des microbes, il peut être utile de posséder des milieux de culture de composition chimique définie ; les modifications survenues dans ces milieux, à la suite du développement des germes, seraient alors plus facilement appréciables. Malheureusement, la plupart des milieux de cet ordre conviennent surtout aux champignons, fort peu aux microbes ; aussi leur usage en bactériologie est-il actuellement fort restreint. Quelques-uns d'entre eux seulement se prêtent au développement de plusieurs espèces microbiennes ; c'est à ces derniers que nous nous limiterons, en y ajoutant quelques milieux d'un intérêt historique.

Leur préparation, une fois la formule connue, ne demande qu'une chose : respecter la formule.

Liquide de Pasteur.

Eau	100 grammes.
Sucre candi	10 —
Tartrate d'ammoniaque	0gr,10
Cendres de levure	0gr,075

Liquide de Cohn.

Eau distillée	100 grammes.
Phosphate de potasse	0gr,50
Phosphate tricalcique	0gr,05
Sulfate de magnésie	0gr,05
Après dissolution, ajouter :	
Tartrate d'ammoniaque	1 gramme.

Liquide d'Ouchinsky.

Eau	1 000 grammes.
Glycérine	30 à 40 —
Chlorure de sodium	5 à 7 —

Chlorure de calcium	0gr,1
Sulfate de magnésie	0gr,02 à 0gr,4
Phosphate bipotassique	2 gr. à 2gr,5
Lactate d'ammoniaque	6 à 7 grammes.
Asparagine	3 à 4 —

Liquide de Frænkel et Voges.

Lactate d'ammoniaque	6 grammes.
Chlorure de sodium	5 —
Asparagine	4 —
Phosphate neutre de soude	2 —
Eau distillée	1000 —

Milieux naturels.

Lait. — Il est très employé. Il se prépare habituellement de la manière suivante :

1° Prendre 500 grammes de lait ; vérifier la réaction qui doit être neutre ou légèrement alcaline.

Le lait du commerce est souvent plus ou moins acide, par suite de la pullulation de bactéries dédoublant le lactose, très répandues dans la nature. Un lait acide est inutilisable, parce que les altérations produites par ces bactéries peuvent gêner le développement ultérieur des autres microbes.

2° Répartir en tubes de 8 à 15 centimètres cubes.

3° Boucher, stériliser à l'autoclave.

Maintenir les tubes stérilisés pendant quarante-huit heures à l'étuve; la stérilisation habituelle (quinze minutes à 115°) est parfois insuffisante, et un chauffage plus énergique altérerait sensiblement le milieu. La non-stérilité serait démontrée par la coagulation des tubes non stériles.

Pour certains microbes délicats, on peut avoir intérêt à ne pas chauffer à 115°, ni même à 100°. On stérilisera alors par chauffage discontinu à 58°, comme pour le sérum, mais ce procédé de stérilisation n'est pas bien sûr pour le lait. En dehors du chauffage à 115°, la stérilisation ne serait bien assurée que par le chauffage discontinu à 100°.

On recommande souvent aussi de prélever le lait aseptiquement, de manière à pouvoir l'employer cru et stérile, sans qu'il soit besoin d'une stérilisation ultérieure. Il est prudent de n'accorder à cette méthode qu'un crédit limité ; la traite véritablement aseptique n'est guère réalisable, même en faisant usage d'appareils à mulsion stérilisables.

Lait tournesolé. — Au lait cru, ajouter la quantité de teinture

de tournesol sensible nécessaire pour donner une teinte nettement violacée. Opérer ensuite comme ci-dessus.

Petit-lait. — Employé surtout après addition de tournesol : *petit-lait tournesolé* (milieu de Petruschky).

1° Prendre 1 100 grammes de lait.

2° En prélever 100 grammes ; porter à l'ébullition et l'y maintenir ; ajouter petit à petit une solution d'acide chlorhydrique au dixième contenue dans une éprouvette de Mohr. Agiter constamment. Arrêter quand la coagulation apparaît. Constater quelle quantité exacte, *a*, de la solution chlorhydrique a été employée.

3° Dans un autre récipient, porter à l'ébullition les 1 000 grammes restants. Ajouter la quantité de solution chlorhydrique représentant neuf fois *a*. En agitant constamment, ajouter ensuite *goutte à goutte* de la solution, jusqu'à ce que le liquide se coagule.

Cette manière de faire a pour but d'apprécier approximativement, par une épreuve préalable, combien il faut employer d'acide. Il est ensuite plus facile d'ajouter la quantité complémentaire juste suffisante. L'addition d'un excès d'acide serait nuisible, même après neutralisation.

4° Laisser reposer quelques heures à la glacière, puis décanter le liquide exsudé ; filtrer. Il faut plusieurs filtrations successives pour obtenir un milieu à peu près clair.

5° Neutraliser. Ajouter la quantité de teinture de tournesol juste nécessaire pour teinter.

6° Répartir en tubes, stériliser par chauffage discontinu à 100°.

On peut également se procurer dans le commerce le petit-lait tournesolé tout préparé.

Urine. — Très employée aux débuts de la bactériologie (notamment par Pasteur), l'urine est à peu près abandonnée aujourd'hui.

Le chauffage modifiant sensiblement sa composition, il est préférable de la stériliser par filtration.

On pourra essayer, sans grand espoir de réussite, d'obtenir une urine stérile par cathétérisme aseptique. En ce cas, vérifier la stérilité en maintenant les tubes deux jours à l'étuve avant usage.

II. — MILIEUX NON ALBUMINEUX SOLIDES

Milieux artificiels

Ces milieux représentent les milieux liquides, *solidifiés* par addition de gélatine ou de gélose.

Milieux solides animaux. — ***Gélatine.*** — En incorporant aux milieux liquides une certaine proportion de gélatine, on obtient des milieux qui demeurent solides au-dessous d'une température déterminée (en moyenne 25°) et se liquéfient au-dessus.

Les milieux à base de gélatine ne supportent pas la température de l'étuve à 37°.

Gélatine ordinaire. — On désigne ainsi, ou encore simplement *gélatine*, le bouillon solidifié par addition de gélatine.

Procédé de choix. — *a* à *c*. Comme pour le bouillon (Voy. p. 117).

d. Jeter sur un linge propre, exprimer, recueillir dans un vase émaillé.

e. Chauffer doucement (ne pas dépasser 80° environ). Ajouter pour 1 litre :

Peptone.....	20 grammes.
Sel marin.....	5 —
Gélatine.....	120 —

On utilisera exclusivement la gélatine *extra-fine* du commerce.

Faire dissoudre, en agitant constamment, et sans dépasser la température indiquée.

f. Neutraliser. — C'est un temps délicat. Ajouter peu à peu la solution de soude, en vérifiant constamment la réaction au tournesol. S'arrêter quand la réaction est neutre.

g. Porter à l'autoclave ; chauffer dix minutes à 112°. Les albumines de la viande se coagulent et collent le milieu.

h. Au sortir de l'autoclave, filtrer sur papier-filtre ordinaire.

La filtration se fait généralement bien à la température ambiante. Si la gélatine fait prise, filtrer comme il sera dit pour la gélose.

Exceptionnellement, il peut arriver que le liquide filtré ne soit pas clair. Coller alors au blanc d'œuf, comme nous le verrons pour la gélose ; porter à nouveau à l'autoclave et filtrer.

i. Répartir. Stériliser à 110° pendant dix minutes. Ne pas dépasser 110°.

j. Au sortir de l'autoclave, maintenir droits les tubes de gélatine droite ; maintenir inclinés les tubes de gélatine inclinée (Voy. *Gélose*), jusqu'à solidification complète. Conserver au frais.

Variantes. — 1° En été, on peut employer 14 p. 100 ; en hiver, 8 p. 100 de gélatine. Le point de fusion s'élève d'autant plus qu'il y a plus de gélatine. Mais au delà de 15 à 18 p. 100, les colonies microbiennes sont moins typiques.

2° Si l'on a une provision de bouillon, on peut se contenter d'ajouter au bouillon 12 p. 100 de gélatine. Neutraliser (la gélatine est acide). Coller au blanc d'œuf. Le reste comme ci-dessus.

3° Pour la stérilisation, il peut être préférable d'employer le

chauffage discontinu à 100°, qui abaisse le point de fusion moins que le chauffage à 110°.

4° On peut, au lieu de bouillon, utiliser les *extraits de viande* (Voy. *Bouillon aux extraits de viande*), plus 12 p. 100 de gélatine ; neutraliser.

Autres milieux à base de gélatine. — En principe, tous les milieux liquides peuvent être solidifiés par addition de gélatine.

En pratique, le seul milieu gélatiné d'usage courant est la gélatine ordinaire, que nous venons de décrire.

D'autres milieux ont été préconisés : milieu d'Elsner (gélatine et purée de pommes de terre), milieu de Grimbert (modification du précédent), milieu de Rémy, milieu de Nœggerath, etc. On en trouvera la description dans tous les traités de bactériologie un peu anciens. Ces milieux étant à peu près inutilisés aujourd'hui, il nous paraît peu nécessaire de les décrire.

Gélose. — La *gélose* est une matière gélatineuse extraite de l'*agar-agar*, produit qui vient d'une algue des mers des Indes, *Gelidium spiniforme*. En pratique, les mots « gélose » et « agar-agar » sont synonymes.

La gélose du commerce se présente sous forme de filaments secs, durs, grisâtres. Elle peut absorber, en se gonflant, une grande quantité d'eau, environ 200 à 250 fois son poids. La *gelée* ainsi produite se liquéfie à chaud, à 65° ou 70° ; refroidie, elle demeure en surfusion jusque 40° ou 42°, et se solidifie à des températures inférieures. Aussi les milieux à base de gélose supportent sans se liquéfier toute température inférieure à 65°. Ils permettent en particulier, contrairement à la gélatine, les cultures à 37°, ce qui constitue leur avantage essentiel.

Inconvénients : la gelée est difficile à filtrer. Elle demeure toujours un peu louche, mais le collage assure une transparence très suffisante.

Peu ou pas nutritive, la gélose constitue avant tout un support pour les milieux nutritifs.

Gélose ordinaire. — C'est le bouillon ordinaire, solidifié par addition de gélose.

Procédé de choix. — *a* à *g*. Comme pour le bouillon ordinaire (p. 117).

h. Peser 20 grammes de gélose sèche. Faire macérer pendant quelques heures dans l'eau. Exprimer.

Ajouter cette gélose (lavée et gonflée) au filtrat, alcalinisé. Porter sur le feu ; faire bouillir à feu très doux, en agitant constamment jusqu'à dissolution complète.

Vérifier la réaction. Elle doit être légèrement alcaline (certaines géloses sont acides et pourraient acidifier sensiblement le milieu).

i. Laisser refroidir vers 60°. Casser un œuf, recueillir le blanc dans 50 à 100 centimètres cubes d'eau ; ajouter au liquide refroidi à 60°. Mélanger.

j. Porter à l'autoclave à 118° pendant quinze minutes. Ne pas trop remplir les récipients ; la gélose, très visqueuse, tend à déborder quand on ouvre le robinet de vapeur.

L'albumine de l'œuf se coagule en gros flocons, entraînant les particules solides : c'est le *collage*.

k. Au sortir de l'autoclave, filtrer à chaud sur filtre Chardin mouillé. La gélose se solidifiant facilement, la filtration est difficile à la température ambiante ; ou peut opérer ainsi :

Disposer le filtre sur un entonnoir en verre ; placer l'entonnoir sur un récipient (matras à col court, vase à précipiter, etc.) supportant bien la chaleur ; mettre le tout dans l'autoclave, encore chaud ; verser la gélose sur le filtre, couvrir (plaques de verre, compresse) ; poser le couvercle de l'autoclave, sans écrous, robinet ouvert ; chauffer doucement. Ouvrir de temps à autre pour surveiller la marche de la filtration.

l. Verser la gélose filtrée, très chaude, dans l'entonnoir à répartition (p. 141). Répartir très rapidement.

Pour la répartition en tubes :

La gélose peut être employée en *tubes droits* ou en *tubes inclinés* (fig. 43). Verser par tube sur une hauteur de 4 travers de doigt pour les tubes droits, 3 travers de doigt pour les tubes inclinés.

Fig. 43. — A. Tube de gélose droit (à gauche) et incliné (à droite). — B. Inclinaison des tubes de gélose.

Si la répartition était trop laborieuse (température très basse), utiliser l'entonnoir à filtration chaude (Voy. ci-dessous).

m. Stériliser à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes.

n. Au sortir de l'autoclave :

Maintenir droits les tubes de *gélose droite* ;

Pour les tubes de *gélose inclinée* : les incliner, ouverture en haut, de telle sorte que le bec de la gélose s'arrête à quelques centimètres du bouchon d'ouate (fig. 43).

Se servir comme supports de baguettes de verre, de règles, etc. Maintenir inclinés pendant vingt-quatre heures. Relever ensuite.

Variantes. — 1° Si l'on possède du bouillon tout préparé, simplifier les opérations : les temps *a* à *g* ci-dessus sont supprimés. A partir du temps *h*, comme ci-dessus.

2° La proportion de gélose n'a rien d'immuable. On pourra ajouter depuis 0,4 (milieu à peine solide) jusqu'à 4 p. 100 (milieu très solide), suivant les indications. Si le milieu doit être additionné ultérieurement d'un autre liquide (sérum, sang), employer 3 à 4 p. 100 de gélose.

3° Dans le but de faciliter l'adhérence aux parois, on peut ajouter 2p. 100 de gélatine (au temps *h*), ou, plus simplement, laisser sécher les bords par séjour à l'étuve. Ce procédé est surtout indiqué pour les cultures dans le vide.

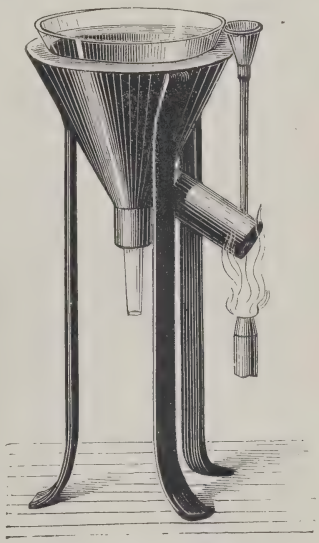

Fig. 44. — Entonnoir à filtration chaude.

4° Pour faciliter la filtration et la répartition, on peut employer l'**entonnoir à filtration chaude** (fig. 44). C'est un entonnoir en cuivre, portant une tubulure latérale, elle-même munie d'une branche montante ; placer l'entonnoir en verre dans l'appareil ; assujettir le col de l'entonnoir au col de l'appareil à l'aide d'un bouchon fermant hermétiquement ; remplir d'eau l'espace vide entre l'entonnoir et l'appareil. Chauffer la tubulure latérale sans atteindre l'ébullition. Quand l'entonnoir en verre est chaud, verser la gélose ; continuer à chauffer jusqu'à la fin de l'opération.

Il existe un grand nombre d'autres modèles d'entonnoirs à filtration chaude (avec double paroi ; avec serpentin à circulation de vapeur d'eau, etc.).

5° *Pour éviter la filtration*, l'opération ayant été conduite comme ci-dessus jusqu'au temps *i* inclus, opérer comme suit :

Placer la gélose dans un entonnoir en verre, coupé au ras du col, la petite ouverture obturée par un bouchon de liège ; porter à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes ; ouvrir le robinet de l'autoclave, enlever le couvercle, enlever la rondelle, replacer le couvercle (sans rondelle) ; laisser refroidir dans l'appareil (pendant la nuit par exemple). — La majeure partie des précipités tombent dans l'effilure du cône. — Renverser l'entonnoir ; vider de son contenu, en frappant d'un coup sec ; enlever l'entonnoir. Abraser toute la partie complètement opaque (pointe du cône) ; abraser, patiemment, les dépôts opaques aberrants. — Découper la partie claire, faire fondre, répartir et stériliser.

Avec le milieu ainsi préparé, il y a au fond des tubes un léger dépôt ; le reste du milieu est clair. C'est suffisant pour les cultures courantes.

Si on voulait un milieu très transparent : découper à la surface (base du cône) des fragments bien clairs ; les répartir en tubes ; stériliser.

Cette préparation simplifiée peut être utilisée avantageusement.

Autres milieux à base de gélose. — *Gélose glycérinée.* — Ajouter 4 à 6 p. 100 de glycérine au bouillon ordinaire. Opérer ensuite comme ci-dessus (variante 1°).

Géloses sucrées. — Préparer comme la précédente, en substituant à la glycérine 2 p. 100 de sucre (glucose, lactose, etc.). Pour l'étude des fermentations sucrées, il est prudent d'employer un bouillon privé de sucre (Voy. p. 119). Tubes droits ou inclinés, suivant les indications.

Gélose glucosée glycérinée. — Elle se prépare comme les précédentes : glucose, 2 p. 100; glycérine, 5 p. 100.

Gélatine-agar. — Le procédé mixte, solidification du bouillon par l'emploi simultané d'agar et de gélatine, donne un milieu qui supporte une température de 37°. La gélatine-agar a été indiquée comme succédané de la gélatine ordinaire en été ou dans les pays chauds ; elle est très peu employée, les colonies perdant leurs caractères les plus saillants.

Préparer comme la gélatine ordinaire, temps *a* à *d*, avec 80 grammes de gélatine pour 1 000. Neutraliser. Ajouter 5 grammes de gélose. Vérifier la réaction, coller au blanc d'œuf, porter à l'autoclave, filtrer, répartir et stériliser (Voy. *Gélose*).

Milieux solides naturels.

Pomme de terre. — I. **Procédé de choix.** — *a.* Prendre des pommes de terre assez grosses, bien mûres, de variété blanche. Nettoyer la surface dans l'eau, éplucher.

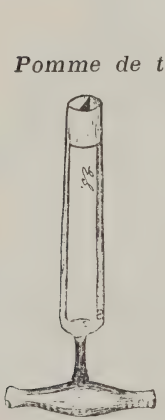

Fig. 45. — Emporte-pièce pour préparation des pommes de terre.

Fig. 46. — Tube à pomme de terre.

b. Avec l'emporte-pièce spécial (fig. 45), découper des morceaux demi-cylindriques. Laver largement à l'eau, essuyer au papier-filtre.

c. Mettre en tubes de Roux (fig. 46). La pomme de terre se pose sur l'étranglement ; l'eau d'exsudation tombe au fond.

d. Stériliser (vingt minutes à 120°).

e. Au sortir de l'autoclave, disposer les tubes de manière que la face plane soit en bas ; si la face convexe adhère au tube, la détacher en frappant un coup sec sur le tube. Laisser vingt-quatre heures dans cette position, relever ensuite

Cette manœuvre a pour but d'empêcher la face convexe d'adhérer au tube et de permettre au morceau de se tenir droit; sans quoi il s'incurverait.

Certaines pommes de terre sont très acides : faire baigner les morceaux pendant plusieurs heures dans une solution de soude à 5 p. 1 000.

L'emploi de l'emporte-pièce et du tube de Roux n'est pas absolument indispensable, mais tous deux sont trop commodes pour n'être pas prévus dans les laboratoires.

II. **Autre procédé.** — Pour cultures en large surface, on peut couper de larges rondelles et disposer en boîtes de Petri.

Pommes de terre glycérinées. — Temps *a* et *b*, comme pour la préparation I ci-dessus.

c. Abandonner les pommes de terre dans l'eau glycérinée, 6 à 15 p. 100 de glycérine, pendant quarante-huit heures.

d. Verser au fond du tube de Roux de l'eau glycérinée, jusqu'à ce qu'elle affleure l'étranglement.

e. Placer la pomme de terre dans le tube de Roux. Boucher.

f. Stériliser.

Purée de pommes de terre. — Nettoyer des pommes de terre, faire cuire, passer au presse-purée, répartir en vases plats (cristallisoirs, boîtes de Petri), stériliser.

Carottes. — Se préparent comme les pommes de terre (préparation I).

Artichaut. — Enlever les feuilles d'un artichaut, mettre à nu le fond, garni de foin. Découper le fond en petits fragments, 1 à 2 centimètres de diamètre. Répartir en tubes de Roux. Stériliser.

III. — MILIEUX ALBUMINEUX PURS.

On emploie le sérum sanguin, les sérosités, le sang, les œufs.

Sérum sanguin. — Le sérum sanguin peut être utilisé à l'état liquide ou après avoir été coagulé par la chaleur ; on désigne généralement le sérum liquide sous le mot *sérum*, sans suffixe ; et le sérum à l'état solide sous le nom de *sérum coagulé* ou *gélatinisé*.

Nous étudierons dans ce chapitre : 1° la préparation du sérum liquide ; 2° la préparation du sérum coagulé, par gélatinisation du sérum liquide.

Préparation du sérum liquide. — Le sérum est obtenu par coagulation du sang. Il faut d'abord prélever le sang, puis laisser coaguler, enfin séparer le sérum.

La plupart du temps, l'espèce animale productrice du sérum est

indifférente. On s'adresse aux grands animaux : cheval le plus souvent, sinon bœuf, veau, âne, etc.

Dans quelques circonstances, il est indiqué au contraire d'employer le sérum des animaux de laboratoire (cobaye ou lapin).

Prélèvement chez les grands animaux. — Il y a toujours avantage à recueillir le sérum aseptiquement, chez un animal sain, ou au moins non infecté ; le sérum, recueilli stérile, peut alors être utilisé sans stérilisation ultérieure. A ce but convient le *procédé de choix*.

Mais, dans les petits laboratoires, on n'a pas à sa disposition de grands animaux ; il faut s'adresser à l'abattoir, où il n'est pas

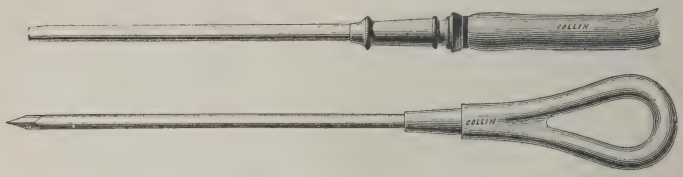

Fig. 47. — Trocart de Roux-Nocard.

toujours possible d'assurer une installation qui permette l'asepsie. On aura recours alors au *procédé de nécessité*.

Procédé de choix. — Procédé de Nocard et Roux. — On préparera d'abord les instruments et accessoires nécessaires :

Un trocart, analogue à ceux des appareils Potain ou Dieulafoy. Le trocart de Roux-Nocard (fig. 47), à manche, est habituellement employé.

Fig. 48. — Flacon préparé pour recueillir le sang.

Un tube de caoutchouc rouge, long d'environ $0^{m},50$, terminé à un bout par un tube de verre à extrémité libre taillée en bec de flûte, à l'autre bout par un ajutage qui s'adapte à la canule.

Des flacons pour recueillir le sang. Ordinairement on se contente de grands flacons cylindriques, $0^{l},500$ à 2 litres, à large ouverture (fig. 48) ; l'ouverture est fermée ainsi : obturer avec plusieurs doubles de papier, serrer une ficelle au-dessus du col pour assujettir cette première fermeture ; au-dessus, placer une deuxième fermeture analogue, qu'on assujettira de même avec une deuxième ficelle, placée plus bas que la première.

Bistouri, ciseaux courbes ; gants de caoutchouc.

Ballon-pipette Chamberland, tubes à essais, ou vases de culture.

Stériliser à l'autoclave, séparément : le trocart ; le tube de caoutchouc ; les gants. Au four Pasteur, le ballon Chamberland, les tubes et vases, le bistouri, les flacons.

Opération. — *a*. Choisir un animal sain, à jeun. On s'adresse le plus souvent au cheval.

Chez le cheval, on prélève sans inconvénient 7 à 12 litres de sang. On peut également utiliser d'autres grands animaux.

La contention des chevaux peut être réalisée au simple tord-nez, seules les bêtes difficiles exigent le travail. Pour les génisses, maintenir sur la table à inoculations vaccinales.

On met à jeun pour éviter l'infection sanguine qui se produit pendant la digestion (Nocard, Dezoubry et Porcher).

b. Repérer la veine jugulaire, raser, désinfecter avec soin.

c. Faire comprimer, par un aide (main droite), la jugulaire à la base du cou (entre la saillie du sterno-mastoïdien et la trachée).

d. Les mains garnies de gants stériles, saisir le trocart. Le glisser, parallèlement au vaisseau, pointe dirigée vers la tête de l'animal, entre la veine et la peau, sur une longueur de quelques centimètres. Relever le manche du trocart ; d'un coup sec, pénétrer dans la veine ; enfoncer. La pointe est libre dans la cavité, ce dont l'opérateur peut se rendre compte.

e. Faire comprimer la veine au-dessus de la pointe du trocart, par le même aide (main gauche ; compression provisoire). Retirer le manche du trocart. Adapter l'ajutage de caoutchouc à la canule. Maintenir la canule de la main gauche.

f. Un deuxième aide enlève l'enveloppe extérieure d'un flacon, flambe rapidement le tube de verre, le fait pénétrer, d'un coup sec, à travers l'enveloppe inférieure, dans le flacon, en dirigeant la pointe du biseau vers la paroi.

g. Faire cesser la compression provisoire (main gauche du premier aide). Le sang s'écoule dans le flacon. Continuer jusqu'à ce que le flacon soit plein aux trois quarts ou aux deux tiers.

h. Comprimer le caoutchouc de la main droite. Le deuxième aide enlève le tube de verre du premier flacon. Il place le tube dans un deuxième flacon, en opérant comme au temps *g* ci-dessus.

i. Un autre aide replace immédiatement l'enveloppe extérieure du flacon rempli.

j. Maintenir les flacons au repos pendant vingt-quatre à quarante-huit heures au frais, mais pas à la glacière (le sérum serait alors laqué).

l. Prélever le sérum à l'aide du ballon-pipette Chamberland.

Variantes. — 1° *Trocart.* — Le trocart de Sivori peut remplacer celui de Roux-Nocard. Il est peut-être plus commode, mais aussi plus compliqué comme structure. C'est une modification du trocart de Potain. Pour les animaux moyens (génisse), on peut utiliser le gros trocart du Potain.

2° *Récipients pour recueillir le sang.* — On peut les varier à l'infini. Citons les plus pratiques (outre le modèle décrit ci-dessus).

Pour recueillir, par flacon, 100 à 200 centimètres cubes de sang, on utilisera avec avantage les fioles d'Erlenmeyer. Sitôt remplies au point voulu, les incliner à 50° environ, le caillot se fixe sur la partie déclive. Pour prélever le sérum, replacer le flacon horizontalement. Le sérum forme nappe à côté du caillot.

3° *Appareil de Latapie pour grands animaux.* — Cet appareil permet d'obtenir plus de sérum (jusque 80 p. 100 de la masse totale, au lieu de 40 à 45 p. 100).

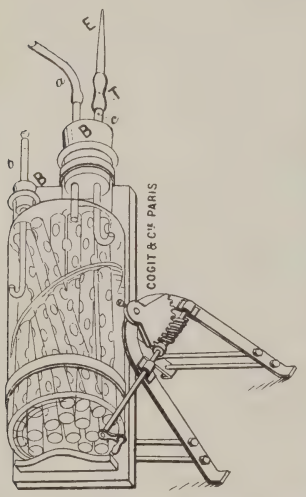

Fig. 49. — Appareil Latapie pour récolte du sérum (grands animaux).

Il se compose (fig. 49) d'un flacon à 3 tubulures, renfermant des tubes de verre à parois perforées (ces baguettes fixent le caillot). Les 3 tubulures laissent passer 3 tubes de verre : l'un, *b*, bouché extérieurement à la ouate, assure la communication avec l'atmosphère. Un deuxième, *a*, muni extérieurement d'un tube de caoutchouc, sera mis en communication avec le trocart. Le troisième, *c*, pénétrant à peine, et courbé à son extrémité intérieure, porte à l'extérieur un tube de caoutchouc, T, terminé par une pipette fermée, E; le tube de caoutchouc sera muni d'une pince de Mohr. Un support permet de faire basculer.

Fonctionnement. — L'appareil ayant été stérilisé à l'autoclave, le disposer goulot en haut; mettre le tube médian en communication avec la canule de Roux et Nocard, en conduisant la saignée comme ci-dessus. Remplir le flacon à moitié (pas plus); condamner (pince de Mohr) le tube *a*.

Laisser reposer vingt-quatre à trente-six heures. Ensuite, renverser l'appareil, bouchon en bas, en faisant basculer. Le sérum tombe au contact du bouchon. Casser la pointe du tube E, recueillir le sérum en vases stériles.

L'appareil est précieux, mais un peu fragile.

Conduite de l'opération. — Dans l'opération décrite comme type, la manœuvre des flacons expose aux contaminations; l'opérateur aura intérêt à la pratiquer lui-même. Il confiera alors au deuxième aide la canule (puis la compression du tube d'écoulement) et prendra la place assignée dans la description au deuxième aide.

Il va sans dire que toutes les opérations devront être exécutées avec la plus rigoureuse asepsie, le sérum obtenu devant être stérile.

Procédé de nécessité. — Il faut recueillir le sang à l'abattoir; on ne pourra guère obtenir un sérum stérile; mais quelques précautions réduiront au minimum les chances de contamination.

Transporter à l'abattoir des boîtes de Koch (fig. 50), stérilisées au préalable à l'autoclave. Elles sont constituées par deux cristallisoirs s'emboîtant l'un dans l'autre; contenance, 2 litres.

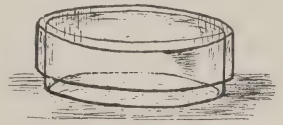

Fig. 50. — Boîte de Koch.

a. Suivre la saignée opérée chez le bœuf. Laisser échapper les premiers jets de sang, très souillés. Puis ouvrir une boîte, remplir de sang à moitié, recouvrir. Faire de même avec les autres boîtes.

b. Laisser reposer les boîtes trente-six ou quarante-huit heures dans un endroit frais. Les incliner un peu. Il est préférable de laisser les cristallisoirs à l'abattoir même; le transport au laboratoire immédiatement après la saignée gêne la rétraction du caillot; le sérum pourrait être laqué.

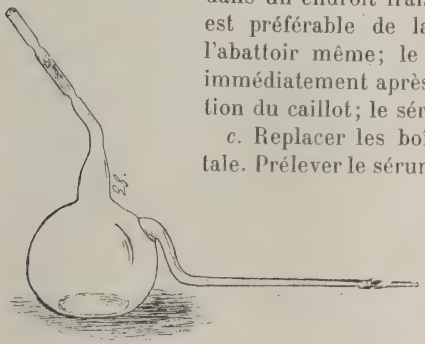

Fig. 51. — Ballon-pipette Chamberland.

c. Replacer les boîtes en position horizontale. Prélever le sérum dans les ballons-pipettes Chamberland (fig. 51).

d. Stériliser par chauffage discontinu ou par filtration.

Prélèvement du sérum chez les petits animaux. — Voyez chap. XIII.

Prélèvement du sérum chez l'homme. — Voy. chap. XIII.

Emploi du sérum à l'état liquide. — Le sérum peut être employé liquide. On aura toujours soin de s'assurer qu'il est stérile, en le maintenant quarante-huit heures à l'étuve avant d'en faire usage; tous les tubes altérés seront rejetés.

Préparation du sérum coagulé. — Chauffé à une température variable suivant les espèces, 68° à 72° en moyenne, le sérum sanguin, prélevé comme il vient d'être dit, se coagule en formant une masse solide, qui se maintient telle après refroidissement. Pour obtenir le sérum coagulé, il est préférable de chauffer à la température minima susceptible d'assurer la solidification; en chauffant plus haut, le sérum deviendrait opaque et perdrait ainsi une qualité essentielle, la transparence.

Procédé de choix. — Utiliser l'*étuve à coagulation de sérum.*

Les modèles actuels (fig. 52) comportent une caisse en cuivre rectangulaire, à double paroi ; fermeture supérieure à l'aide d'un couvercle en verre à double paroi, interposant une couche d'air qui fait corps isolant ; trois ou quatre pieds formant support, l'antérieur

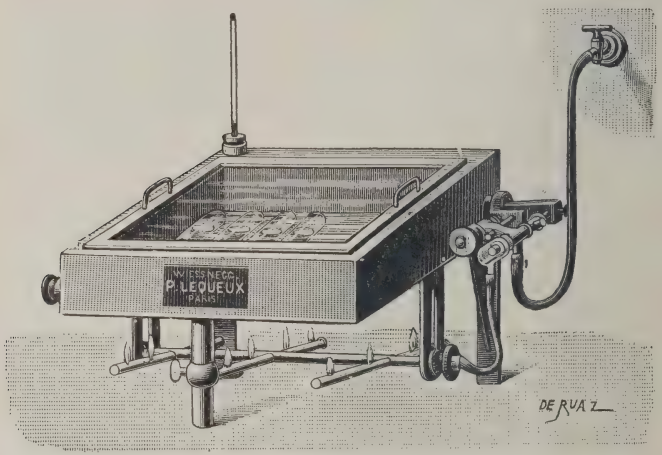

Fig. 52. — Étuve à coagulation de sérum.

ou les deux antérieurs pouvant être allongés ou raccourcis à volonté, pour donner au fond de la caisse l'inclinaison voulue ; brûleur à gaz avec régulateur de Roux. Garnir de sable le fond de la caisse ; remplir d'eau la double paroi.

Un thermomètre peut être plongé dans le matelas d'eau (par un orifice latéral) ; un second être couché sur le fond de la caisse. Pour la première opération (réglage de l'appareil), les deux thermomètres sont utiles ; dans la suite, une fois l'appareil réglé, on se contentera du second.

Fonctionnement. — *a.* Dans les tubes stérilisés, verser du sérum liquide sur une hauteur de 6 centimètres environ.

b. Disposer l'appareil de manière que le fond soit légèrement incliné ; coucher les tubes sur le sable de la caisse. Veiller à ce que le sérum n'atteigne pas le bouchon. Fermer le couvercle. Allumer le gaz.

On peut placer sur le sable quelques boîtes de Petri ouvertes, contenant de l'eau. Coagulé en milieu humide, le sérum est plus transparent (Vagedes).

c. Surveiller le thermomètre. Au moment où la température atteint 68° (pour le sérum de bœuf), régler l'appareil (Voy. p. 145). Continuer à surveiller le thermomètre pendant quelque temps, pour s'assurer que le réglage est bien fait, et le rectifier au besoin.

d. Au bout d'une heure et demie environ, soulever le couvercle, prendre l'un des tubes, voir s'il a fait prise : le tube étant placé verticalement, la colonne de sérum solidifié doit rester parfaitement compacte, comme un tube de gélose inclinée. Si la prise n'est pas faite, remettre le tube en place. Renouveler le même essai de temps à autre.

e. Quand le sérum est bien solidifié, éteindre le gaz. Laisser refroidir un peu. Enlever les tubes, les placer en position verticale, couvrir le bouchon d'un capuchon de caoutchouc stérilisé, pour éviter la dessiccation ultérieure.

Pour enlever les tubes, opérer avec précaution ; certains tubes pourraient n'être pas solidifiés complètement. S'il en est ainsi, les remettre en place, après avoir enlevé les tubes déjà solidifiés ; chauffer à nouveau jusqu'à coagulation complète.

Le sérum de bœuf, coagulé, doit être demi-transparent, très légèrement ambré.

L'inclinaison de l'appareil et le réglage de la température sont opérés une fois pour toutes (sauf modification éventuelle).

Autres procédés. — A défaut d'appareil spécial, on peut encore : *a.* Chauffer le sérum dans une étuve réglée à 68°. Les tubes seront alors disposés sur un support spécial (fig. 53) qui permet de les incliner à volonté. Surveiller avec soin.

b. Placer les tubes dans le support précédent ; mettre un peu d'eau au fond du support, couvrir les tubes d'une lame de verre. On dispose alors le support au-dessus d'une marmite contenant de l'eau, qu'on porte à l'ébullition. Surveiller avec soin. Il faut une à deux heures pour la solidification. Le sérum est opaque.

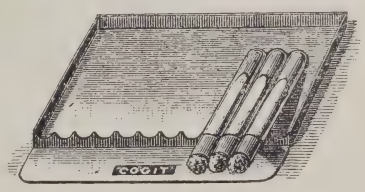

Fig. 53. — Plateau pour coaguler les tubes de sérum.

Sérosités albumineuses. — Pour divers usages, il y a intérêt à substituer au sérum animal le sérum humain. Ce dernier étant difficile à obtenir en grandes quantités, on emploie d'habitude des sérosités pathologiques : liquides d'ascite (cirrhoses de préférence), de pleurésie séro-fibrineuse, d'hydrocèle, etc.

Prélèvement. — Opérer suivant les règles habituelles de la technique médicale ; avoir soin de désinfecter sérieusement la peau (teinture d'iode), de stériliser les instruments et récipients.

a. *Pour l'ascite.* — Mettre le trocart (de Potain par exemple, ou tout autre analogue) en communication avec un tube de caoutchouc, long de $0^{m},50$ à 1 mètre, terminé par un tube de verre un peu rétréci à son extrémité libre. Stériliser l'ensemble à l'autoclave, entouré de papier.

Préparer d'autre part des flacons, disposés comme pour la récolte du sérum (fig. 48), ou comme pour la récolte des filtrats (fig. 42).

On peut également recueillir le liquide en ballons à long col, préparés comme ci-dessus ; après remplissage, sceller le col dans la flamme.

Le liquide d'ascite ne coagule généralement pas, ou très peu. Même clair en apparence, il laisse souvent déposer à la longue un sédiment blanchâtre, qui n'est pas l'indice d'une souillure. Sa coloration est variable ; les plus clairs sont les plus favorables.

L'*opération* est très simple : désinfecter la peau ; ponctionner, en faisant comprimer le caoutchouc par un aide ; laisser écouler les premiers jets de liquide ; comprimer à nouveau ; flamber le tube de verre, découvrir un récipient, introduire le tube ; remplir aux trois quarts.

Comprimer le caoutchouc, enlever le tube, couvrir le récipient ; flamber le tube, passer à un deuxième récipient, et ainsi de suite.

b. *Pour les liquides pleurétiques.* — Ponctionner au Potain. A la tubulure latérale du trocart, adapter un tube de caoutchouc épais.

Préparer un flacon comme celui de la figure 34, d'une contenance de 1 litre à 2 litres ; relier le trocart à E.

Stériliser à l'autoclave tout l'appareil (entouré de papier). Stériliser en même temps, au four Pasteur, des bouchons d'ouate s'adaptant au flacon.

Mode opératoire : désinfecter la peau. Développer l'appareil.

Enfoncer le trocart. Faire le vide par le tube A. Remplir aux deux tiers. Substituer au bouchon de caoutchouc le bouchon d'ouate préparé d'avance.

Laisser reposer quarante-huit heures (rétraction du caillot). Prélever stérilement le liquide, à l'aide du ballon-pipette ou de la pipette à boule.

Plus simplement : préparer des flacons de 1 litre, dont le col s'adapte au bouchon du Potain, stériliser au four Pasteur, boucher à la ouate ; stériliser l'appareil Potain, trocart, raccord de caoutchouc, bouchon. Au moment de l'opération, substituer au bouchon d'ouate le bouchon du

Potain; ponctionner comme d'habitude. Le flacon rempli, boucher à nouveau le flacon avec le bouchon d'ouate, largement flambé. Procédé moins sûr, généralement suffisant.

Règle. — Avant d'utiliser une sérosité comme milieu de culture, il est indispensable de s'assurer qu'elle est stérile. Pour cela : prélever quelques centimètres cubes, mélanger à 10 centimètres cubes de bouillon stérile, mettre à l'étuve. Le tube devra demeurer stérile.

Si l'on avait des doutes sur la stérilité du liquide, on le stériliserait comme le sérum sanguin (chauffage discontinu ou filtration).

Le sérum et les sérosités servent surtout à préparer des milieux divers (gélose-sérum, etc.) ; nous les retrouverons plus loin.

Sang. — **Prélèvement.** — On opère comme pour la récolte du sérum ; la seule variante porte sur le traitement à faire subir au sang pour empêcher la coagulation.

A. **Récolte à l'état liquide.** — 1° Procédé de choix. — Préparer un matras en verre, de 100 à 200 centimètres cubes, à parois résistantes, renfermant des perles de verre ; boucher, stériliser à sec.

Recueillir le sang à la seringue, rapidement, aseptiquement, suivant les procédés indiqués ailleurs; déboucher le matras, transvaser, reboucher, défibriner en agitant pendant cinq minutes. Transvaser ensuite le sang défibriné avec une pipette à grosse effilure.

On peut substituer aux perles de verre des débris de verre : placer des débris de verre (fragments de tubes, de pipettes, de fioles, etc.) dans un mortier ; couvrir d'une compresse épaisse ; tasser fortement au pilon. Quand les morceaux ont en moyenne la grosseur voulue, enlever la compresse, porter le mortier sous un robinet d'eau et laver à grande eau, pour enlever la poussière de verre. Recueillir les fragments restants, placer en matras ; opérer ensuite comme ci-dessus.

Pour défibriner de petites quantités de sang, on se contentera d'un tube à pomme de terre; placer au fond des boules ou fragments de verre.

2° Autres procédés. — On peut empêcher le sang de se coaguler : soit en injectant à l'animal vivant de l'extrait de sangsues, ou pour le chien, de la peptone ; soit en additionnant le sang, dès la sortie de l'organisme, de citrate de soude (3 p. 1 000) ou d'oxalate neutre de potasse (1 p. 1 00).

Dans la plupart des cas, la défibrination est préférable.

B. **Incorporation du sang à d'autres milieux.** — Voy. ci-dessous.

Œuf. — L'œuf peut toujours être infecté, soit avant la ponte, soit après. Le plus souvent, il est stérile. Si le milieu ne doit pas être stérilisé ultérieurement, il est nécessaire de contrôler sa stérilité avant de l'ensemencer.

1° **Blanc d'œuf**. — Chauffer fortement la grosse extrémité; perforer le point flambé avec une pointe métallique stérilisée.

Introduire par le trou, peu profondément, l'extrémité d'une pipette à boule stérile, à large effilure (liquide visqueux, coule difficilement). Répartir en tubes stériles.

2° **Blanc d'œuf coagulé**. — Opérer comme pour le sérum (p. 135, *Autres procédés*, *b*).

3° **Jaune d'œuf**. — Laisser l'œuf une minute dans l'eau bouillante, flamber une extrémité, perforer. Introduire en plein jaune l'extrémité d'une pipette à boule stérilisée. Aspirer. Répartir.

4° **Œuf entier**. — Agiter fortement un œuf, pour mélanger jaune et blanc. Flamber une extrémité. Perforer. Ensemencer à travers le trou, avec une pipette ou un fil de platine. Boucher à la cire.

5° **Tranches d'œuf**. — Faire cuire dure. Enlever la coquille. Couper en tranches avec un couteau propre. Répartir en boîtes de Petri. Stériliser à l'autoclave.

IV. — MILIEUX ALBUMINEUX COMPOSÉS

Bouillon-sérum. — Au bouillon stérile, ajouter le sérum stérile, en proportion variable suivant le but cherché : généralement la moitié, le tiers ou le quart.

Souvent on emploie le *bouillon-ascite*. Même technique.

Gélose-sérum. — 1° Faire fondre de la gélose au bain-marie, vers 70°; après liquéfaction complète, laisser refroidir vers 60°. Ajouter alors la proportion voulue de sérum, généralement un tiers. Laisser refroidir en position inclinée ou répartir de suite en boîtes stérilisées, suivant les indications.

2° Préparer de même la *gélose-ascite*.

3° On peut se contenter de déposer au fond d'un tube de gélose inclinée, solide, 0,5 à 1 centimètre cube de sérum ou d'ascite ; incliner, de manière que le liquide baigne toute la surface ; laisser incliné pendant douze à vingt-quatre heures. Ce procédé ne vaut pas le précédent,

Milieux au blanc d'œuf alcalin. — En vue de permettre la stérilisation par l'autoclave, Sacquépée et Delater préconisent l'addition aux milieux ordinaires de blanc d'œuf, alcalinisé au préalable. Une fois alcalinisé, le blanc d'œuf supporte l'autoclave sans se troubler. Il peut de même être incorporé au bouillon ou à la gélose, sans précipiter, à condition que ces derniers milieux soient eux-mêmes suffisamment alcalins.

Préparation du blanc d'œuf alcalin. — Verser deux blancs d'œuf dans un verre à pied gradué. En agitant constamment, ajouter petit à petit trois fois leur volume d'eau distillée. Une fois le mélange obtenu, ajouter un demi-centimètre cube de soude au dixième, pour 100 centimètres cubes de mélange. Agiter. Porter à l'autoclave à 115°.

Préparation de la gélose. — Préparer la gélose comme ci-dessus (p. 125) de *a* à *f*. Incorporer alors 3 p. 100 de gélose, faire dissoudre. A ce moment, neutraliser exactement. Après neutralisation, ajouter, par litre, 9 centimètres cubes de soude au dixième.

Coller ensuite comme d'habitude, porter à l'autoclave, filtrer.

Mélange. — Mélanger 1 partie de blanc d'œuf alcalin à 5 parties de la gélose précédente. Répartir, stériliser 15 minutes à 112°.

Même mode de préparation pour le *bouillon au blanc d'œuf alcalin.*

Bouillon-sang. — Opérer comme pour le bouillon-sérum, en substituant au sérum le sang défibriné.

Sang gélosé. — 1° Faire fondre la gélose, laisser refroidir à 42°. Dans chaque tube, recevoir 1 centimètre cube de sang, au sortir de l'artère (Voy. chap. XIII). Mélanger, incliner, laisser refroidir.

2° Autre technique, plus pratique : à la gélose fondue et refroidie, ajouter la proportion voulue de sang défibriné.

On peut substituer au sang l'*hémoglobine*, stérilisée par filtration.

Gélose sanglante. — Étaler quelques gouttes de sang à la surface d'un tube de gélose. Incliner (Voy. *Gélose-sérum*, 3°).

Sérum glycériné. — A 100 centimètres cubes de sérum stérile, ajouter 6 à 8 grammes de glycérine neutre stérilisée ; répartir en tubes ; gélatiniser, comme le sérum ordinaire, mais la température de solidification sera portée à 75°.

Bouillon-sérum glucosé (milieu de Lœffler). — Préparer du bouillon ordinaire, glucosé à 1 p. 100 ; au bouillon glucosé stérile, ajouter trois fois son poids de sérum stérile; gélatiniser à 70-75°.

CONSERVATION ET TRANSVASEMENT DES MILIEUX.

Conservation. — Dans tous les laboratoires, il est nécessaire de faire des provisions des milieux les plus employés ; il faut donc les conserver.

Les milieux seront conservés à l'abri de toute contamination, de l'évaporation et de la lumière solaire.

a. On évite les contaminations en assurant d'abord, suivant les procédés déjà connus, la stérilité du milieu et des récipients qui le contiennent, en protégeant ensuite contre l'accès des germes de l'extérieur. La protection est absolue et définitive quand le récipient est scellé : matras ou ballon à long col, scellé au col. En pratique, le scellement est rarement indispensable ; il suffit de disposer les milieux dans des flacons à ouverture relativement étroite, bien bouchés à la ouate : matras ou ballons, fioles de Vivien, fioles d'Erlenmeyer, fioles de pharmacie, etc.

b. Si le milieu doit être conservé très longtemps dans une atmosphère sèche (étuve), il est prudent de limiter l'évaporation en couvrant le bouchon d'un capuchon de caoutchouc.

Capuchons de caoutchouc. — Les capuchons seront ou bien stérilisés à l'autoclave, puis séchés à l'étuve; ou bien conservés dans une solution antiseptique (acide phénique à 2 p. 100).

c. Les récipients contenant les milieux seront placés à l'obscurité.

Transvasement. — On répartit les milieux en récipients appropriés à leur destination immédiate et énumérés ailleurs, soit pour conservation (Voy. ci-dessus), soit pour cultures aérobies (p. 165), ou anaérobies (p. 172). La manière de faire est très différente suivant qu'on envisage les milieux non stériles (destinés à être stérilisés ultérieurement) ou les milieux stériles.

Transvasement des milieux non stériles. — Une précaution essentielle : éviter de mouiller le col des récipients. Si le col est mouillé, les bouchons sont humides ; après stérilisation, ils adhèrent à la paroi, s'il s'agit de milieux liquides solidifiés; de plus ils protègent mal.

Pour répartir en récipients de grande contenance, on se servira d'un entonnoir à longue effilure.

Pour répartir *en tubes à essai* (fig. 54) : adapter à l'extrémité libre d'un entonnoir moyen un tube de caoutchouc, muni d'une pince à pression continue et terminé par un tube de verre effilé ; disposer cet entonnoir sur un support ; verser le liquide, plonger l'effilure dans le tube à essai, assez profondément, ouvrir la pince, remplir au degré voulu, fermer la pince ; passer à un autre tube. — Quand on veut répartir gélatine ou gélose, il est prudent de chauffer d'abord l'entonnoir en y versant de l'eau chaude.

Après répartition, boucher et stériliser les tubes ou récipients.

Transvasement des milieux stériles. — Quand le milieu stérile ne doit plus être stérilisé après répartition, il est nécessaire d'opérer les transvasements d'une manière absolument aseptique :

opérer aseptiquement et rapidement ; *répartir en vases stériles avec des appareils stériles.*

a. De petites quantités seront transvasées avec une simple pipette ou une pipette à boule. Mêmes précautions qu'en *b*.

b. La répartition de quantités appréciables de liquide exige l'emploi d'appareils spéciaux. Le plus employé est le **ballon-pipette Chamberland** (fig. 54). Couvrir de papier l'effilure de la pipette, boucher au coton la tubulure supérieure, stériliser à sec.

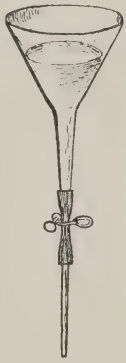

Fig. 54. — Dispositif pour répartition des liquides non stériles.

En prenant les mêmes précautions d'asepsie que pour l'ensemencement (p. 158), ouvrir l'effilure, plonger la pipette dans le liquide, aspirer, remplir le ballon aux trois quarts, retirer la pipette. Répartir ensuite en tubes ou ballons stérilisés.

On prescrit généralement de *sceller* l'effilure des ballons-pipettes; ce n'est pas indispensable.

c. Un **flacon répartiteur** (fig. 55) convient également. On prépare le bouchon de pissette, s'adaptant au récipient qui contient le liquide stérile : bouchon à deux trous, traversé par deux tubes : l'un, P, coudé à angle droit, bouché au coton entre deux étranglements, plongeant peu (tube de compression); l'autre, coudé à angle très aigu, formé de deux branches longues, l'extérieure coupée par un tube de caoutchouc avec pince de Mohr et terminée par une effilure scellée, l'intérieure plongeant presque à fond (tube de répartition). Le bouchon avec ses annexes est stérilisé à l'autoclave.

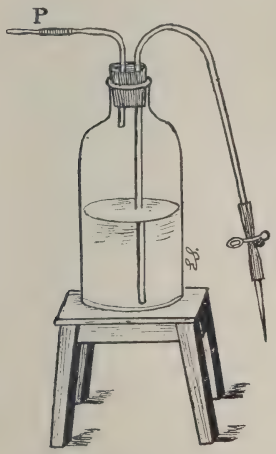

Fig. 55. — Flacon répartiteur.

Pour l'usage : le récipient est placé sur un support; avec les précautions d'asepsie habituelles, on substitue au bouchon (ouate) du récipient le bouchon préparé; toujours aseptiquement, on casse l'effilure du tube de répartition, on comprime de l'air (avec une poire) par le tube de compression : le liquide passe et s'écoule ensuite par siphonage; on active l'écoulement en continuant la compression; on dispose autour de l'effi-

lure le vase (tube ou ballon stérilisé) destiné à recevoir le liquide.

Quand on veut arrêter la répartition : cesser la compression; porter l'effilure à proximité de la flamme; sans déplacer l'effilure, incliner le flacon de telle manière que le niveau du liquide soit plus bas que l'extrémité de l'effilure: le siphon se désamorce, l'air rentre, mais stérilisé par la flamme ; sceller.

Dans la répartition du sérum filtré, on peut simplifier la manœuvre en utilisant le flacon à trois tubulures décrit page 710.

Il ne faut pas multiplier ces répartitions; on frôle inévitablement la contamination. Autant que possible, répartir tout le liquide en une seule séance. En pratique, on ne répartit de cette manière que par nécessité, pour les milieux (sérum, sérosités), qui supportent mal la chaleur.

CHAPITRE VIII

ÉTUVES ET RÉGULATEURS

Pour les cultures et certaines manipulations, il est indispensable de maintenir les milieux à température constante. C'est la raison d'être des étuves.

Dans les laboratoires, il faut toujours au moins une grande étuve, d'usage courant, réglée à 37°. D'autres étuves sont nécessaires pour cultures ou manipulations, variables suivant les circonstances (le plus souvent 42°, analyses d'eaux; 55°, paraffine, précipitines). Il est bon également de maintenir à 22° les cultures sur gélatine.

Presque toujours, on veut une température **supérieure à la température ambiante**, et par suite il faut chauffer les étuves.

Si la température extérieure est plus élevée que la température cherchée, il devient difficile de régler exactement les étuves. Le cas ne se présente guère que pour les cultures sur gélatine pendant la saison chaude ou dans les pays chauds. On peut se contenter de maintenir les cultures ou les produits dans un espace clos refroidi extérieurement soit par la glace, soit par un courant d'eau. On pourrait dans ce but faire circuler l'eau dans la double paroi des étuves qui s'y prêtent.

Le *chauffage* des étuves peut être opéré par toutes les sources de chaleur. En pratique, on a tout avantage à se servir du gaz. Éventuellement on peut utiliser l'électricité, le pétrole, etc.

Règles générales. — *a. Toute étuve doit posséder un régulateur automatique de température.*

Le régulateur proprement dit sera toujours placé soit dans l'étuve même, soit dans le matelas d'eau qui l'entoure.

Les annexes peuvent être disposées dans l'étuve même (chambres-étuves) ou en dehors, ce qui est habituel.

b. L'étuve doit être *protégée contre les variations trop grandes de la température extérieure* à l'aide d'une paroi mauvaise conductrice de la chaleur : bois, feutre, couche d'air, matelas d'eau.

c. Il ne faut pas de lumière dans l'étuve (défavorable aux cultures).

La porte vitrée, qui existe presque toujours, sera peinte en noir ou couverte de papier noir.

d. Il est bon de laisser *accès à l'air extérieur* (E. Roux), pour dissiper les gaz de fermentation et provoquer de légers courants d'air qui uniformisent la température dans l'appareil.

e. Un thermomètre (au moins) sera placé à demeure dans l'étuve.

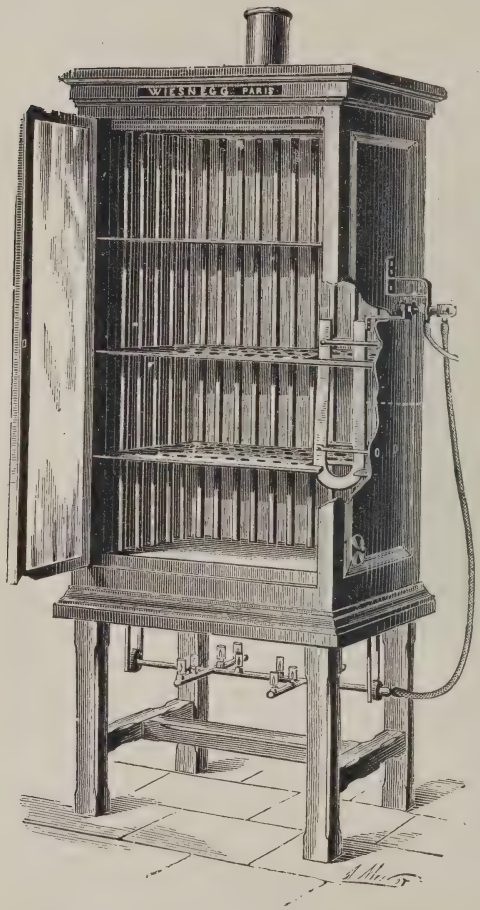

Fig. 56. — Étuve de Roux.

I. — Étuves chauffées au gaz.

Étuve de Roux. — C'est le modèle le plus répandu, à juste titre. Elle suffit à tous les besoins du laboratoire.

1° Corps de l'étuve (fig. 56). — Il comporte une armoire en bois, avec double porte vitrée, étagères horizontales, portée sur pieds. Contre la paroi interne, des tubes de cuivre traversent toute la hauteur pour aboutir en haut à une cheminée d'évacuation. Le chauffage est obtenu à l'aide d'un brûleur à gaz placé au-dessous de l'appareil.

Les gaz et l'air chaud provenant du brûleur circulent dans les

tubes en cuivre pour s'échapper par la cheminée ; par rayonnement, les tubes en cuivre chauffent l'intérieur de l'étuve. Des ventouses latérales permettent l'accès de l'air.

2° **Régulateur de Roux.** — Il est basé sur le principe de l'inégalité de la dilatation des métaux sous l'influence de la chaleur.

a. Le régulateur (fig. 57) a la forme d'un U, formé de deux métaux soudés ensemble : zinc en dehors, acier en dedans. Grâce à cette disposition, les branches tendent à se rapprocher quand la température s'élève, à s'écarter quand elle descend.

b. L'une des branches du régulateur, celle de gauche sur la figure, est fixée à la paroi de l'étuve. La branche droite, seule mobile, se termine à son extrémité libre par une tige rigide (en Z couché) ; les déplacements imprimés au régulateur par les variations de température se trouvent ainsi totalisés à l'extrémité libre du Z.

Les mouvements de la branche mobile commandent la distribution du gaz.

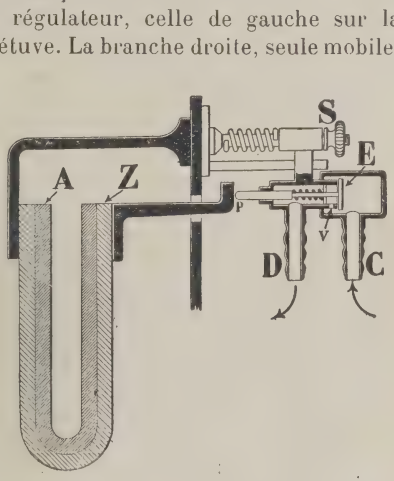

Fig. 57. — Régulateur bimétallique en U.

c. Le gaz est amené par le tuyau C ; pour arriver au tuyau D, qui le conduit au brûleur de l'étuve, il doit trouver passage libre autour du clapet (bouchon en laiton) E : or le clapet s'ouvre ou se ferme, suivant les mouvements du régulateur.

d. En effet, quand la température de l'étuve s'abaisse, la branche mobile de l'U s'écarte, emmenant la tige en Z ; cette dernière repousse la tige qui porte le clapet : passage libre, le gaz peut accéder au brûleur. Si, au contraire, la température s'élève, mouvement inverse : le clapet, sollicité par un ressort à boudin, ferme la communication ; le gaz ne passe plus.

Toutefois, même quand la soupape est fermée, un peu de gaz passe par le trou de veilleuse V, pour permettre au brûleur de ne pas s'éteindre complètement (veilleuse).

3° **Réglage.** — Pour régler à 37° par exemple :

Tourner la vis S, de manière à ouvrir le clapet E ; ouvrir le robine à gaz ; allumer.

Surveiller la température de l'étuve. Quand elle atteint 36°,5,

tourner la vis en sens inverse, s'arrêter juste au moment où la flamme baisse en veilleuse.

Une fois l'étuve en marche, on peut faire varier la température ; pour l'élever, ouvrir le clapet (en tournant la vis), surveiller et opérer comme ci-dessus. Pour l'abaisser, fermer le clapet ; surveiller la température, ouvrir à nouveau quand on est à 0°,5 au-dessous de la température désirée.

En réalité, la température peut varier de quelques dixièmes de degré d'un étage à l'autre. Il est bon de vérifier de temps en temps la température des divers étages.

L'étuve est réglée une fois pour toutes ; si on l'éteint et qu'on la rallume ensuite, la température doit se fixer au même degré qu'antérieurement.

On aura soin de graisser (vaseline) de temps à autre par les orifices ménagés à cet effet sur les organes de glissement (tige du clapet surtout).

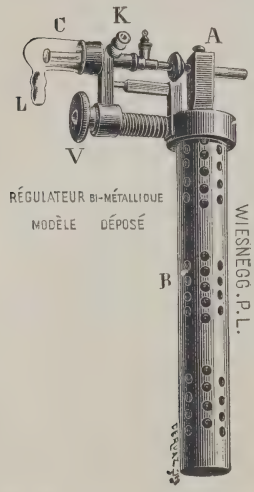

Fig. 58. — Régulateur bimétallique droit.

4° Autres régulateurs métalliques. — A. Régulateur de Roux, forme droite.

Pour les étuves à eau, le régulateur de Roux conserve toujours la même composition ; l'agencement est différent (fig. 58) ; les deux lames sont soudées, zinc du côté du clapet ; une des extrémités est encastrée au fond d'un tube métallique B, perforé sur ses parois ; l'autre extrémité, A, libre, commande l'arrivée du gaz comme ci-dessus.

Ce modèle peut être adapté à l'étuve ordinaire (à eau), à l'étuve à coagulation (fig. 52) ou à stérilisation (fig. 31) de sérum.

B. **Régulateur à action directe (Lequeux).** — Ce régulateur comporte un tube A en métal très dilatable par la chaleur, soudé à son extrémité libre avec une tige d'acier B très peu dilatable. Les mouvements de A se trouvent ainsi *directement* (sans coudure) et intégralement transmis, par B, à la vis à écrou I, qui entraîne avec elle la lame d'acier D, encastrée en K et disposée de manière à amplifier les mouvements. L'extrémité libre de D agit sur la tige du clapet qui règle l'admission du gaz (fig. 59).

Le tube est installé dans le milieu dont on veut régler la température. On relie *b* à la prise de gaz et *a* au brûleur.

Pour régler la température : serrer I de manière à placer la lame D perpendiculairement au tube de dilatation ; dévisser la vis placée au bas de C ; amener la tige du clapet P juste au contact de D, revisser. — Visser I :

la lame D repousse la tige du clapet, le gaz passe; allumer les brûleurs.

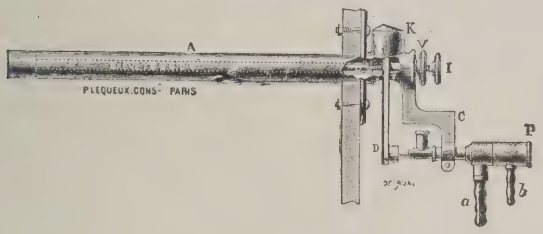

Fig. 59. — Régulateur à action directe.

Surveiller le thermomètre; régler exactement comme pour le régulateur de Roux.

Les régulateurs métalliques des divers modèles décrits ci-dessus sont très robustes et très sensibles.

Chambre-étuve. — Dans les grands laboratoires, il est utile de posséder une chambre à température constante. Le chauffage sera obtenu par un poêle ou un brûleur à gaz, muni du régulateur métallique de Roux; calorifère et régulateur sont dans la pièce.

Étuve d'Arsonval. — **1° Corps de l'étuve** (fig. 60). — Il est constitué par deux caisses cylindriques concentriques, en cuivre, à fond bombé. A la partie supérieure, une douille avec trop-plein. Latéralement, le régulateur. Dans l'intervalle entre les deux caisses, de l'eau.

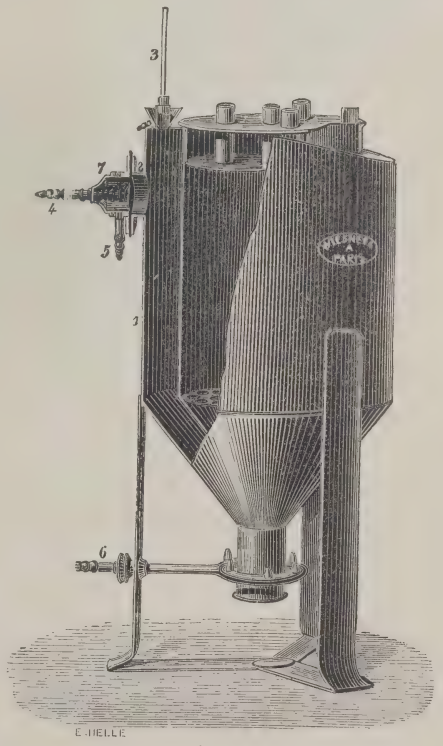

Fig. 60. — Étuve d'Arsonval.

2° **Régulateur** (fig. 61). — Basé sur le principe de la dilatabilité des liquides, il est constitué par une simple membrane B, métallique, très flexible, dont la position, variable, règle le débit du gaz, venant par le tube C, pour gagner ensuite le brûleur par D. Les mouvements de la membrane sont commandés par la pression du liquide : si la température s'élève, l'eau se dilate, monte dans le tube de dilatation, et par suite la pression *h* exercée sur la membrane augmente : la membrane est repoussée et ferme l'amenée de gaz. Tout abaissement de température produira l'effet inverse.

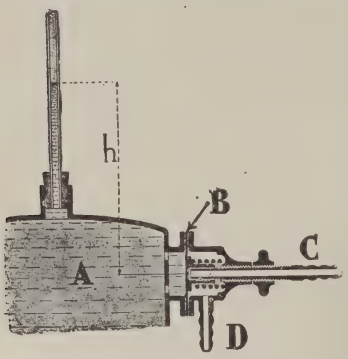

Fig. 61. — Régulateur à membrane.

3° **Fonctionnement et réglage.** — Remplir d'*eau bouillie*, complètement, par la douille supérieure, jusqu'à déversement par le trop-plein, muni au préalable d'un tube de caoutchouc pour écoulement de l'eau en excès. (L'eau bouillie est nécessaire, sans quoi il se dégagerait ultérieurement des gaz, et l'étuve serait déréglée.) Fermer la douille avec un bouchon de caoutchouc, muni d'un tube de verre, 3.

L'orifice du tube C étant ouvert (en dévissant l'écrou placé sur ce tube), allumer. Surveiller l'ascension de la température dans l'étuve ; quand le thermomètre arrive à 5° au-dessus du point voulu, visser un peu le tube d'arrivée (baisser la flamme) et fixer par l'écrou ; suivre le thermomètre. Une fois atteint le degré voulu, visser jusqu'à veilleuse. Surveiller ensuite, sans impatience : visser ou dévisser le tube d'arrivée du gaz, suivant que la température est trop haute ou trop basse.

Mettre du pétrole dans le tube 3 pour éviter l'évaporation de l'eau.

Ces étuves fonctionnent bien. Le matelas d'eau est un excellent système de protection. Le régulateur doit être remplacé de temps à autre.

Autres étuves. — Il existe nombre d'autres modèles d'étuve Babès, Chauveau, Arloing, etc.). La plupart ne présentent pas d'avantages sur les précédents.

Signalons un très bon modèle qui associe au corps d'étuve genre d'Arsonval un régulateur de Roux.

Autres régulateurs. — Outre les régulateurs de Roux et de d'Arsonval, on a utilisé et on utilise parfois encore d'autres modèles qu'il est bon de connaître.

a. Le *régulateur de Chancel* (fig. 62) est peu coûteux, mais fragile (en

verre) et manque de sensibilité ; il permet le réglage à 3° ou 4° près. Il est basé sur la dilatation du mercure sous l'influence de la chaleur.

Le gaz, arrivant par A, parcourt ensuite la branche verticale descendante, pour s'échapper par B. Une vis latérale V permet d'abaisser ou d'élever à volonté le niveau du mercure. — Pour régler : baisser le niveau du mercure (avec la vis) au-dessous de l'orifice inférieur du tube en T ; au voisinage de la température voulue, revisser, jusqu'à ce que le liquide affleure l'orifice. — Une ouverture, visible sur la branche descendante du T, permet toujours la combustion en veilleuse.

b. On a construit des appareils utilisant la dilatabilité de l'éther (Rohrbeck), de l'air (Bohr). Ils n'ont plus d'intérêt actuellement.

Fig. 62. — Régulateur de Chancel.

II
Étuves chauffées à l'électricité.

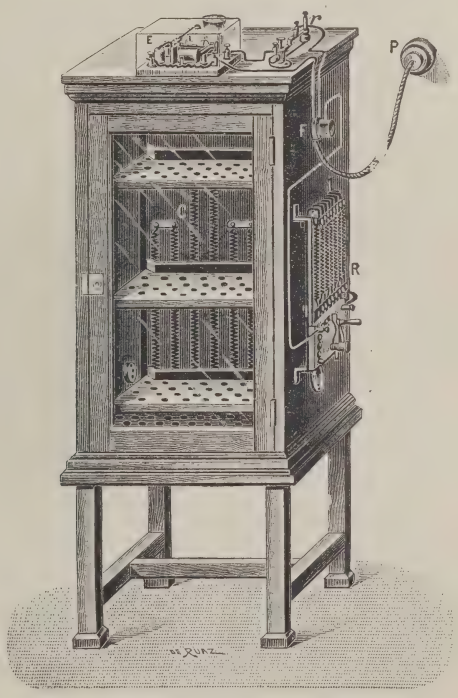

Fig. 63. — Étuve chauffée à l'électricité (Lequeux).

On peut substituer au gaz l'électricité, quand le laboratoire est relié à un secteur électrique.

Il suffit de signaler le modèle représenté sur la figure 63. Le courant électrique échauffe deux séries de résistances : la première série, commandée par le rhéostat R et placée au bas de l'étuve donne un chauffage constant et joue le rôle de veilleuse. La

leuxième série, en C, est commandée par un régulateur analogue au régulateur bimétallique et chauffe plus ou moins suivant les mouvements de ce dernier.

III. — Étuves chauffées au pétrole.

Ce sont toujours des appareils de nécessité, d'un réglage approximatif. L'un des meilleurs modèles est l'étuve Hearson.

Étuve Hearson. — Le corps de l'étuve comprend une caisse à double paroi, avec matelas d'eau (A), tube d'amenée d'eau (O), robinet de vidange (N) et trop-plein (M), thermomètre, K (fig. 64).

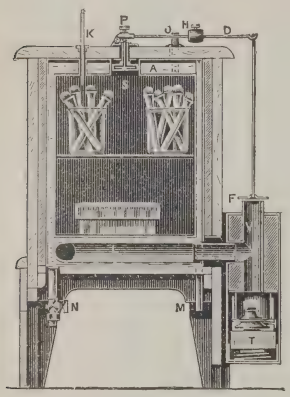

Fig. 64. — Étuve Hearson, au pétrole.

Le chauffage est assuré par une lampe à pétrole, T; les gaz chauds de la lampe ou bien passent en L et chauffent l'étuve, ou bien s'échappent directement à l'extérieur par la cheminée V et ne chauffent pas; c'est le registre F qui commande l'un ou l'autre mode de circulation des gaz.

Ce registre F traduit, par l'intermédiaire de la tige coudée D et de la vis P, les mouvements du régulateur à capsule S, renfermant un liquide bouillant à diverses températures (34° pour les étuves à régler à 37°). Toute dilatation de la capsule a pour effet d'élever F, c'est-à-dire de supprimer le chauffage, et inversement.

Fonctionnement (pour étuve à 37°). — Remplir d'eau chauffée à 30°; placer la lampe; pousser le poids H vers la gauche, à fond; visser P de manière à baisser F. — Surveiller. Quand F se soulève, ramener le poids H un peu vers la droite, pour fermer F. — Continuer ainsi, en déplaçant H, jusqu'à ce qu'on ait atteint la température voulue. A ce moment fixer H (à l'aide d'une vis).

Recharger la lampe toutes les douze ou vingt-quatre heures.

L'appareil se règle assez bien, à condition que la température de la pièce ne soit pas trop variable et surtout ne s'abaisse pas trop.

IV. — Appareil improvisé.

En l'absence de régulateur, on peut chauffer un espace clos (caisse à double paroi) avec un nombre plus ou moins grand de veilleuses à huile, placées sous la caisse, dans leur position habituelle (en radeau sur une couche d'huile, couvrant elle-même une épaisseur quelconque d'eau; récipient à volonté). On peut régler un peu en variant le nombre des veilleuses et leur éloignement de la caisse (Salomonsen). Extrêmement approximatif.

V. — Étuves à destinations spéciales.

A. *Étuve pour cultures dans le vide.* — Pour les cultures des microbes anaérobies, on fait le vide dans l'étuve même; cette étuve

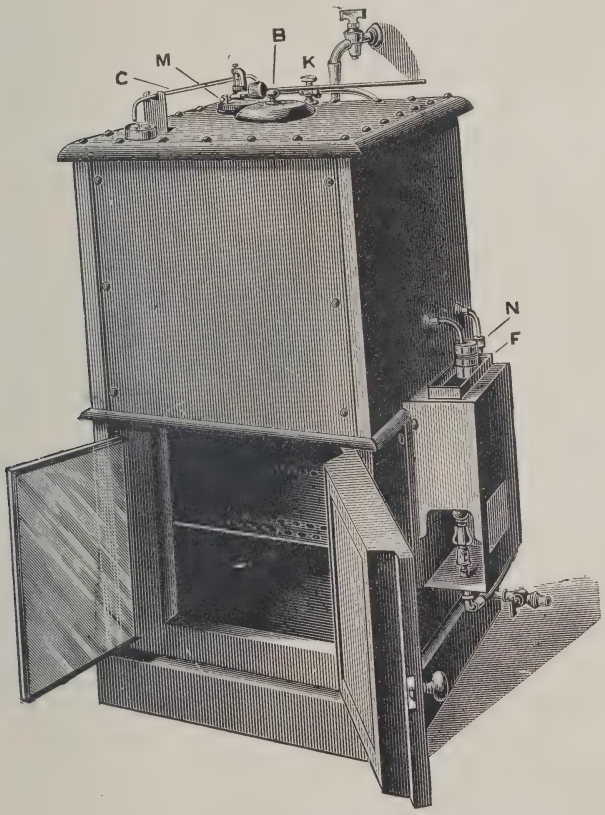

Fig. 65. — Étuve Hearson pour cultures à basse température.

représente un cylindre horizontal (corps de l'étuve) fermé aux deux bouts, avec brûleur à gaz muni d'un régulateur de Roux et tubulure latérale pour faire le vide.

On peut se contenter (L. Martin) d'une cloche métallique hermétiquement close, avec ajutage permettant de faire le vide; la cloche est placée dans une étuve ordinaire, dont elle prend la température.

B. *Étuves pour cultures à basse température* (*à 20°-22°*). — Signalons le modèle *Hearson* (fig. 65). Corps de l'étuve, matelas d'eau et régulateur, comme l'étuve à pétrole ci-dessus. La conduite C amène l'eau de K; son extrémité libre se dirige vers la droite ou vers la gauche, obéissant aux mouvements du régulateur à capsule M. Suivant la position qu'elle occupe, la conduite déverse l'eau soit à l'extérieur, soit dans le matelas d'eau, après refroidissement à travers la glacière B, ou au contraire après réchauffement à travers la chaudière F.

CHAPITRE IX

PROCÉDÉS DE CULTURE ET ENSEMENCEMENT DES MICROBES AÉROBIES

I. — PROCÉDÉS DE CULTURE HABITUELS

Le principe général est de cultiver en présence de l'air. On varie la forme des récipients et, éventuellement, la disposition des milieux suivant le but qu'on se propose.

Récipients de cultures. — Les récipients peuvent affecter les formes les plus diverses ; toutefois la pratique a montré les avantages de certains modèles ; il nous suffira de signaler rapidement ceux qui sont d'usage courant.

Pour milieux liquides. — Le récipient le plus employé est le simple *tube à essais.* Diamètre habituel : 15 centimètres × 15 millimètres. Il faut en outre des tubes petits ($0^m,12 \times 0^m,011$) et grands ($0^m,20 \times 0^m,020$).

On y répartira les milieux sur une hauteur de 3 travers de doigt environ (tubes moyens).

Quand on veut pratiquer les cultures en plus grande quantité,

Fig. 66. — Matras Pasteur.

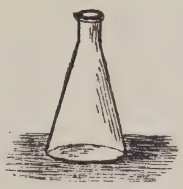

Fig. 67. — Fiole d'Erlenmeyer.

Fig. 68. — Fiole de Gayon.

ou bien donner au milieu plus de surface (plus d'aération), on emploie des ballons ou fioles ; les plus utilisés sont :

Le *matras Pasteur* (fig. 66), bouché à l'émeri, excellent mais fragile

La *fiole d'Erlenmeyer* (fig. 67) ;
La *fiole de Gayon* (fig. 68) ;
La *fiole de Vivien* (fig. 69) ;
Les *ballons ordinaires, à fond plat* (fig. 70) ou *à fond rond*. Les ballons à fond rond nécessitent des supports spéciaux (valets).

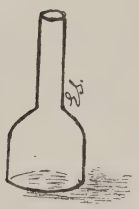

Fig. 69. — Fiole de Vivien.

Fig. 70. — Ballon à fond plat.

Dans certains cas, les cultures demandent une aération très large : les dispositifs seront indiqués à propos de la préparation de la toxine diphtérique.

Pour milieux solides. — Ici encore, on emploie le plus souvent le simple tube à essai. La gélatine ou la gélose y seront réparties soit en couche profonde, *tubes droits*, pour ensemencements en piqûres ; soit en large surface, *tubes inclinés*, pour ensemencements en stries, isolements, cultures en masse (Voy. p. 126).

En vue d'appliquer les méthodes d'isolement (Voy. ci-dessous), ou d'obtenir une culture très abondante, il est souvent nécessaire d'ensemencer en large surface. On utilisera alors :

Les fioles de Gayon, d'Erlenmeyer ou de Vivien, citées plus haut ; ou, de préférence :

Les *fioles plates de Roux* (fig. 71) ou analogues, pour cultures massives ;

Les *boîtes de Petri* (fig. 72), pour les isolements. Les boîtes de Petri se prêtent mal aux cultures *prolongées*, parce qu'elles se

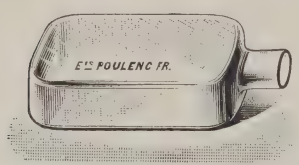

Fig. 71. — Fiole plate de Roux.

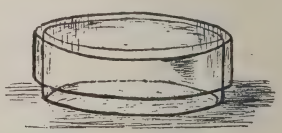

Fig. 72. — Boîte de Petri.

contaminent facilement ; par contre, elles permettent aisément l'observation et le prélèvement des colonies, opérations essentielles dans les isolements.

Les cultures sur pommes de terre demandent des tubes spéciaux (fig. 45).

II. — ENSEMENCEMENTS

Ensemencer, c'est porter un germe dans un milieu nutritif.

L'ensemencement est une opération tellement courante qu'on ne peut même énumérer en détail ses indications ; citons le *repiquage* des microbes (ou leur transplantation d'une culture ancienne sur un milieu neuf) ; la *recherche* de microbes pathogènes dans les produits pathologiques ; etc.

Suivant les circonstances, les modes d'ensemencement peuvent varier. Mais il est des règles fondamentales qu'il faut toujours observer :

L'ensemencement sera pratiqué sur des milieux stériles, avec des instruments stériles.

Il ne modifiera en rien la semence (ne pas la contaminer ; ne pas la stériliser).

Il sera pratiqué purement, c'est-à-dire qu'on n'introduira dans le milieu neuf rien d'autre que la semence elle-même.

Ne jamais oublier de stériliser le porte-semence (fil de platine, pipette), *sitôt après usage.*

Le débutant doit s'exercer à ensemencer *automatiquement*, suivant les règles voulues.

On se mettra à l'abri de tout courant d'air (portes et fenêtres fermées ; pas de mouvements brusques).

Les ensemencements sont généralement faits au fil de platine ou à la pipette, plus rarement à l'aide d'une spatule d'étalement. On se servira du fil toutes les fois qu'il sera possible ; il est plus maniable et plus facile à stériliser.

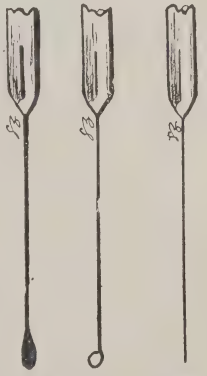

Fig. 73. — Fils de platine droit, en anse, en spatule.

Préparation des fils de platine. — Il existe des fils de platine d'épaisseurs variées ; il faut posséder trois épaisseurs différentes : fil fin, moyen, gros, mesurant environ 3/10, 7/10 et 1 millimètre.

On peut donner aux fils bien des dispositions ; les suivantes (fig. 73) répondent à la plupart des besoins : fil *droit*, mince, et fil droit, moyen ; fil *en anse* (*öse* des Allemands), mince, et fil en anse, moyen ; fil écrasé *en spatule*, gros. On dispose en anse à l'aide d'une pince ; en spatule, en écrasant avec un marteau.

Le fil, bon conducteur de la chaleur, et d'ailleurs toujours trop mince pour être rigide, doit être monté,

Montage des fils. — A. On peut monter soi-même, sur verre.

a. Prendre du verre plein, ou verre en baguettes, de 4 à 6 millimètres d'épaisseur, couper (couteau à verre) des segments de 20 à 25 centimètres de long. — Pour couper le verre : à l'aide du couteau, entailler d'un trait franc, bien transversal ; placer un doigt de chaque côté du trait, briser la baguette.

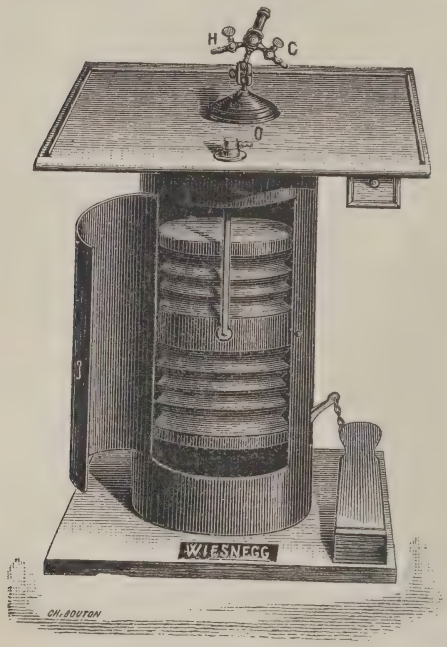

Fig. 74. — Chalumeau à gaz.

Couper d'autre part des fils de platine de longueur voulue (en moyenne 6 à 8 centimètres).

b. De la main gauche, porter dans la flamme chauffante (bleue) du chalumeau (Voy. ci-dessous) l'extrémité d'une baguette sur 1 à 2 centimètres ; tourner constamment ; chauffer jusqu'à ramollissement.

En même temps, de la main droite, prendre avec une pince le fil de platine, porter une extrémité dans la flamme et chauffer au rouge blanc.

c. Toujours dans la flamme, enfoncer le fil dans le verre, ramolli, suivant l'axe du verre, sur 1 centimètre environ. Continuer à chauffer doucement (flamme blanche), pour laisser refroidir progressivement.

Enlever ensuite ; donner au fil la forme voulue.

Chalumeau à gaz. — On emploie généralement les chalumeaux à gaz et à air sous pression (fig. 74) ; l'air comprimé par la soufflerie (à pédale) s'échappe par le tube O, qu'on raccorde au tube H ; en C, amenée de gaz. On rend la flamme à volonté chauffante (bleue) ou non (blanche), en propulsant plus ou moins d'air par O. D'autre part, on varie également à volonté la hauteur (et la largeur) de la flamme, en ouvrant plus ou moins le robinet d'amenée du gaz. On peut substituer au chalumeau à gaz la lampe de soudeur.

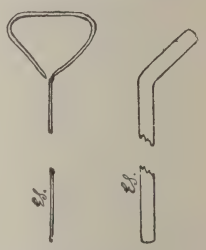

Fig. 75. — Spatule et baguette d'étalement.

B. On trouve dans le commerce des fils de platine montés sur manches métalliques.

Préparation des spatules ou baguettes d'étalement. — a. *Spatules* (fig. 75). — Couper des segments de fil de fer, épaisseur 3 milli-

mètres, longueur 18 centimètres ; disposer comme l'indique la figure. Stériliser.

b. Baguettes (fig. 75). — Porter dans la flamme du chalumeau un tube de verre plein, de 4 millimètres d'épaisseur et 20 centimètres de longueur ; couder comme l'indique la figure 75. Stériliser.

Préparation des pipettes Pasteur (fig. 76). — On se sert du verre en tubes du commerce ; diamètres courants, 4 à 10 millimètres. Avoir soin d'exiger un verre suffisamment épais.

a. Couper un tube (longueur, 1 mètre) en quatre segments. Roder les extrémités à une forte flamme, laisser refroidir. Boucher au coton les deux extrémités ; les bouchons ne doivent pas déborder.

b. Porter au four Pasteur, stériliser.

c. Après refroidissement, étirer au chalumeau : saisir la pipette aux deux extrémités, la présenter à la flamme obliquement, de manière à chauffer une assez grande surface, au milieu du tube ; tourner constamment entre les doigts ; chauffer jusqu'à ramollissement.

d. Rapidement : appuyer les coudes, écartés, sur la table ; éloigner le tube de la flamme ; l'étirer, horizontalement, à la longueur désirable : en moyenne, la partie effilée mesurera 30 à 40 centimètres.

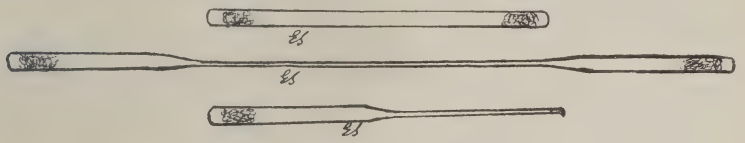

Fig. 76. — Préparation des pipettes Pasteur.

Maintenir en position jusqu'à refroidissement.

e. Baisser la flamme du chalumeau ; fondre dans la pointe de la flamme le milieu de l'effilure ; séparer les deux pipettes.

Remarques. — 1° La technique précédente donne des pipettes d'effilure moyenne. On peut avoir besoin d'effilures plus petites (augmentation de la capillarité) ou plus grosses (aspiration de liquides visqueux ou grumeleux). Il suffit de modifier le temps *c*.

Pour obtenir des effilures petites : diminuer la surface de chauffe, en présentant le tube presque normalement à la flamme.

Pour obtenir des effilures plus grosses : augmenter la largeur des segments de verre (35 à 40 centimètres) ; au temps *c*, présenter le tube très obliquement.

2° On se sert également de *pipettes à étranglement* (fig. 77). La pipette est d'abord préparée comme ci-dessus ; après refroidissement, porter dans la flamme, sur environ 1 centimètre, la partie sous-jacente au bouchon ; ramollir incomplètement, étirer doucement à longueur voulue.

3° Il est économique de fabriquer soi-même les *pipettes à boules* (fig. 78). Prendre une pipette Pasteur, effilure scellée; présenter à la flamme chauffante du chalumeau la partie large du tube, en tournant constamment et régulièrement entre les doigts, jusqu'à ramollissement complet; enlever alors la pipette, souffler progressivement par l'ouverture libre.

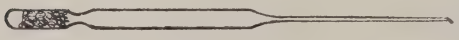

Fig. 77. — Pipette à étranglement.

Ensemencement au fil de platine. — 1° ***Ensemencement de tube liquide à tube liquide*** (fig. 79). — Fil de platine petit, en anse.

a. Prendre dans la main gauche, entre le pouce et l'index, le tube ensemencé ; maintenir le tube en position très inclinée (pour éviter la chute des poussières).

S'assurer que le bouchon est bien libre; le tirer légèrement.

Fig. 78. — Pipette à boule.

De la main droite, saisir le manche du fil de platine à anse, vers son extrémité libre; le maintenir comme une plume à écrire. Stériliser dans la flammelle fil de platine et la partie du manche voisine du fil.

Fig. 79. — Ensemencement d'un tube de bouillon (vue de face).

b. Le fil refroidi, déboucher le tube en prenant et maintenant le bouchon entre l'annulaire fléchi et la paume de la main.

c. Flamber rapidement l'orifice du tube-semence. Plonger l'anse

de platine dans la culture, en veillant à ce que le manche ne touche pas le liquide. Retirer le fil, sans toucher aux bords du tube.

Flamber l'orifice, reboucher, poser le tube.

d. Prendre le tube neuf dans la main gauche, maintenir incliné, déboucher (comme en *a*).

e. Ensemencer (même opération qu'en *b*).

f. Avant d'abandonner le fil de platine, le stériliser.

g. Flamber et assujettir les deux bouchons. Mettre une étiquette désignation, date, etc.). Porter à l'étuve.

Si les tubes doivent être conservés longtemps, placer un capuchon.

Au lieu d'étiquette, on peut porter les indications sur le tube même, au crayon gras ou à l'encre de vitrier.

2° *Variantes suivant le milieu à ensemencer.* — A. **Ensemencement sur milieux solides, en strie.** — Fil de platine petit, droit.

Temps *a* à *d*, comme ci-dessus. Ne pas trop incliner le tube neuf, pour éviter que l'eau de condensation ne dissémine les germes à la surface.

e. Plonger l'extrémité du fil de platine jusque près du fond du tube. La ramener vers l'orifice, en ligne droite ou sinueuse en frottant légèrement la surface, sans enfoncer.

f et *g*. Comme ci-dessus.

Pour ensemencer sur *pomme de terre*, il faut prendre un fil moyen ou gros. Certains microbes (tuberculose) doivent être inoculés en plein tubercule et non simplement déposés à la surface.

Pour la *gélatine*, tenir le tube entre le pouce et l'index, au-dessus de la gélatine, non au niveau de cette dernière (pour éviter la fusion).

B. **Ensemencement sur milieux solides, en surface.** — Fil de platine petit, en anse.

Comme en A, sauf au temps *e* :

e. Promener le fil sur toute la surface du milieu (barbouiller).

C. **Ensemencement sur milieux solides, en piqûre.** — Fil de platine moyen, droit.

On peut opérer comme en A, sauf au temps *e* :

e. Enfoncer le fil au milieu du cylindre solide, profondément, parallèlement au grand axe.

Fig. 80. — Ensemencement d'un tube de gélatine, par piqûre.

La technique suivante est préférable (fig. 80) :

a à *c*. Comme ci-dessus.

d. Prendre le tube neuf dans la main gauche, le placer verticalement, ouverture en bas.

e. Amener le fil de platine, bien vertical, au contact du milieu solide; le maintenir fixé dans cette position. Laisser glisser le tube entre les doigts, verticalement; le milieu s'empale sur l'aiguille. Une fois atteinte la profondeur voulue, laisser le fil de platine se dégager seul, en maintenant cette fois le tube.

f et *g*. Comme ci-dessus.

3° *Variante suivant le milieu du prélèvement.* — **Prélèvement sur les milieux solides; ensemencement en tube de bouillon.** — Fil de platine moyen, en anse ou droit.

Comme en 1° ci-dessus, sauf aux temps *c* et *e* :

c. Porter le fil de platine sur la culture ; en prélever un fragment.

e. Porter l'extrémité du fil sur la paroi du tube neuf, légèrement au-dessus du liquide ; incliner le tube pour amener un peu de liquide au niveau du fil ; frotter ce dernier contre la paroi, pour dissocier la semence et la diluer dans le bouillon.

f et *g*. Comme en 1°.

Ensemencement à la pipette. — Nécessaire pour ensemencer de grandes quantités de milieux liquides en partant d'autres milieux liquides. Suivant la nature et la vitalité des germes, on ensemence par litre de milieu neuf quelques gouttes ou 1 centimètre cube de culture.

Nécessaire également pour les semences contenues dans des pipettes (cultures conservées, produits pathologiques).

Ensemencement de tube liquide à ballon liquide. —

a. Prendre le tube-semence dans la main gauche.

Dans la main droite, prendre une pipette stérilisée, l'effilure assez longue pour que seule elle ait à pénétrer dans le tube et dans le ballon. Avec une pince flambée, casser la pointe. Flamber l'effilure en passant trois ou quatre fois dans la flamme. Laisser refroidir.

b. Déboucher le tube-semence.

c. Plonger la pipette, aspirer la semence; appliquer la pulpe de l'index sur l'extrémité libre pour maintenir le liquide aspiré. Retirer la pipette, sans toucher au bord du tube. Reboucher le tube.

d. De la main gauche, soulever le bouchon du ballon, flamber l'orifice ; replacer le bouchon, en laissant à découvert juste la place nécessaire pour insinuer l'effilure de la pipette entre le bouchon et la paroi ; enfoncer l'effilure; enlever le doigt obturateur. Le liquide tombe. Enlever la pipette.

c. Reboucher le ballon, étiqueter, mettre à l'étuve ; stériliser la pipette.

Ensemencement d'un produit contenu dans une pipette. — Couper le tube au milieu du bouchon, casser sans déboucher; flamber l'orifice, enlever le bouchon, prélever le produit avec une pipette, ensemencer.

Ensemencement par étalement (spatule d'étalement ou baguette). — Pour milieux solides en large surface ; en boîte de Petri par exemple.

Déposer la semence sur un point de la périphérie ; étaler régulièrement, en badigeonnant toute la surface.

III. — INCUBATION ET OBSERVATION ULTÉRIEURE.

Les cultures ensemencées seront mises à l'étuve à la température voulue (37° pour la plupart des milieux ; 22° pour la gélatine).

A défaut d'étuve à 22°, les cultures sur gélatine seront laissées à la température ambiante.

On dispose les tubes dans des paniers métalliques, des cylindres de carton ou des porte-tubes.

Il faut ensuite suivre le développement des cultures, noter leurs caractères. Nous étudierons plus loin les caractères spéciaux à chaque microbe. On pourra suivre d'ordinaire le programme suivant.

Conditions générales de culture. — *Température optima. Températures limites* (supérieure et inférieure) compatibles avec le développement.

Rapidité de développement sur les divers métaux.

Odeur (fade, urineuse, fécaloïde, etc.). L'odeur est généralement plus perceptible sur milieux liquides.

Pouvoir chromogène : colorations verte, rouge, jaune, etc. Ces colorations sont d'ordinaire plus nettes sur milieux solides.

Cultures en milieux liquides. — A. Milieux transparents : bouillon, bouillons sucrés, sérum, etc. — *Modifications apparentes des cultures* en bouillon, prises comme type.

A *la surface*, il peut exister un *voile* d'épaisseur variable, parfois plissé, humide (*B. subtilis*) ou sec (*B. de Koch*) ; ou un voile mince, en radeau (Vibrion cholérique) ; ou une simple collerette sur les bords.

La *masse du liquide* peut être *uniformément trouble*, donnant parfois des ondes moirées par agitation (*Bacille typhique*) ; ou bien le liquide peut demeurer clair, la culture se manifestant par des *grumeaux* ou des *flocons*, tantôt déposés au fond ou sur la paroi

(*Streptocoque*), tantôt demeurant en suspension (*Bacille pesteux*).

Au fond, il peut se former d'emblée un *dépôt*, parfois très adhérent (*Entérocoque*), le plus souvent facile à désagréger par agitation. A la longue, toute culture trouble donne un dépôt.

Le développement s'accompagne parfois d'un *dégagement de gaz*.

Autres modifications. — La *réaction* du milieu, originellement neutre ou légèrement alcaline, peut devenir ou acide (*B. coli*), ou alcaline, ou présenter successivement les deux modifications (*Bacille de Lœffler*). On s'en rendra facilement compte en déposant une goutte de culture sur papier tournesol.

On peut voir apparaître des produits de désintégration, spécialement l'*indol*.

B. Lait. — Le lait demeure liquide ou *se coagule*. Tout en demeurant liquide, il *s'éclaircit* parfois à la longue. La *réaction* peut devenir acide ou alcaline.

Cultures en milieux solides. — A. Milieux transparents. Gélatine. — Noter avant tout si le milieu est ou n'est pas *liquéfié*; à quelle date apparaît la liquéfaction. On suivra plus utilement la liquéfaction sur les cultures en piqûre ; la liquéfaction peut se faire en cupule (Vibrion cholérique), en entonnoir (Staphylocoque).

Gélatine, gélose, sérum. — A part la liquéfaction, les caractères généraux de cultures peuvent être esquissés de la même manière. Ces caractères sont presque toujours le plus nets sur gélatine.

Cultures en strie. — La *culture* peut être : transparente (Bacille typhique) ou opaque (*Staphylocoque*); saillante ou plane, en ruban ; à surface lisse ou irrégulière ; homogène ou non homogène (plus épaisse ou plus opaque au centre ou à la périphérie) ; humide ou sèche ; visqueuse (*Pneumobacille*) ou non (prélevée au fil de platine, une culture visqueuse s'étire en filament). Préciser en outre la largeur (en millimètres).

Cultures en piqûre. — La culture peut : être limitée à la piqûre, culture *en trait* ; se développer davantage à la surface, culture en *clou* (Pneumobacille) ; se limiter à la surface, plane (en disque) ou bombée, plus ou moins large ; présenter dans la profondeur des ramifications, culture *arborescente* (*Bactéridie charbonneuse*).

Certains microbes dégagent des bulles de gaz insolubles ou peu solubles, qui fragmentent le milieu.

B. Pomme de terre. — Mêmes caractères qu'en A, sauf la transparence.

IV. — PROCÉDÉS DE CULTURE EXCEPTIONNELS.

Cultures sous le microscope,— Il y a quelquefois intérêt à suivre sous le microscope le développement d'un germe. En pareil cas, il est nécessaire de faire la culture dans un appareil qui permette l'examen à tout instant, tout en s'opposant à l'évaporation du milieu, en permettant l'accès de l'air et en maintenant autant que possible la température eugénésique.

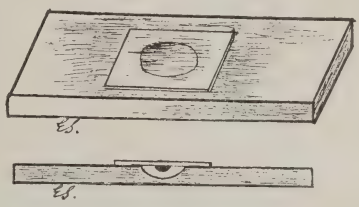

Fig. 81. — Cellule de Koch.

On emploie dans ce but les cultures en cellules.

Cellule de Koch (fig. 81). — C'est une lame porte-objet ordinaire, creusée au centre d'un trou en godet ; en couvrant d'une lamelle, on délimite une cellule.

Mode d'emploi. — Nettoyer soigneusement la lamelle avec un linge stérile ; achever la stérilisation en chauffant très rapidement ; un chauffage prolongé favorise trop l'étalement du liquide. D'autre part, ensemencer une quantité quelconque du milieu choisi.

Déposer au centre de la lamelle une petite goutte du milieu ensemencé ; renverser sur la cellule, en évitant que la goutte ne touche nulle part les parois. Luter les bords à la vaseline. Mettre à l'étuve. Examiner en temps opportun. Remettre à l'étuve dans l'intervalle des examens. C'est la culture *en goutte suspendue*.

Fig. 82. — Cellule de Bottcher.

Cellule de Bottcher (fig. 82). – C'est un simple anneau de verre, qu'on fixe sur une lame ordinaire; fixer à la vaseline ou à la cire. Préparer ensuite la lamelle et le milieu, disposer en goutte suspendue, etc., comme ci-dessus.

Chambre humide de Ranvier (fig. 83). — Elle peut servir au même but; la lame est percée d'une rigole circulaire, délimitant un plateau dont la surface est en contre-bas de 10 millimètres par

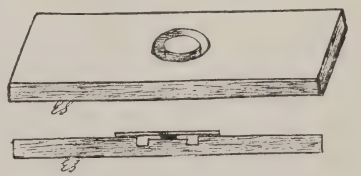

Fig. 83. — Chambre humide de Ranvier.

rapport au reste de la lame. Déposer sur le plateau une petite goutte du milieu ensemencé, couvrir d'une lamelle, luter, etc.

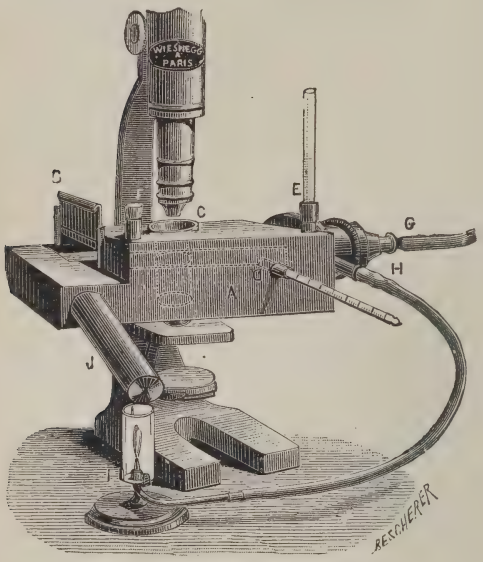

Fig. 84. — Platine chauffante de Vignal.

Les procédés précédents exposent les préparations à la température ambiante et nécessitent des déplacements. Il peut être nécessaire de maintenir pendant l'examen la température de culture (37° le plus souvent), ou de ne pas déplacer le champ soumis à l'observation. On utilise alors les platines chauffantes; citons celle de Vignal, qui se place sur la platine du microscope.

La *platine chauffante de Vignal* (fig. 84) a l'avantage de constituer une petite étuve à température constante avec régulateur d'Arsonval (p. 148) ; ce n'est d'ailleurs qu'une étuve d'Arsonval modifiée.

La préparation, disposée comme ci-dessus, est glissée sous la porte B ; elle y demeure en permanence.

Cultures en sacs de collodion. — Voyez chap. XII.

Conservation des semences (*cultures, produits pathologiques*).

a. Les microbes développés dans les milieux de culture peuvent être conservés quelque temps dans le milieu même. En général, la conservation est plus longue au froid (glacière), à l'obscurité, en tubes profonds (gélose en piqûre). Mais il y a des exceptions, qui seront indiquées en temps utile.

b. Il est d'ordinaire préférable de conserver les semences à l'abri de l'air en pipettes scellées. Aspirer la semence dans la partie large d'une pipette à étranglement jusqu'à quelques millimètres de l'étranglement; obturer avec le doigt l'extrémité libre; sceller l'effilure, un peu au-dessus de la pointe, dans une petite flamme (veilleuse du bec Bunsen) ; sceller de même au niveau de l'étranglement. Conserver à l'obscurité et au frais.

CHAPITRE X

ISOLEMENT DES MICROBES AÉROBIES

Isoler un microbe, c'est l'obtenir en culture pure.

L'isolement est le premier temps, indispensable, de l'étude et de l'identification des germes. Il doit toujours être pratiqué quand on veut étudier un produit quelconque au point de vue bactériologique, même lorsqu'il s'agit d'un produit pathologique qu'on *suppose* être infecté par une seule espèce microbienne.

Il existe un grand nombre de méthodes d'isolement.

Tout d'abord des **méthodes générales** applicables dans tous les cas, et seules applicables toutes les fois que l'observateur n'a aucune idée préconçue sur la nature des espèces présentes.

Si, au contraire, on veut chercher telle ou telle espèce déterminée, il peut y avoir intérêt à employer des **méthodes spéciales**, basées sur la connaissance des propriétés biologiques particulières à l'espèce :

Soit des *artifices de séparation* ;

Soit des *milieux de culture électifs* ;

Soit l'*inoculation aux animaux*.

I. — MÉTHODES GÉNÉRALES.

Elles ont pour but de séparer les microbes un à un dans les milieux d'isolement, de telle sorte que chacun d'eux donne naissance à une colonie bien séparée (milieux solides) ou à une culture absolument pure (milieux liquides).

Comme milieux d'isolement, on n'emploie guère que les milieux solides ; nous les envisagerons exclusivement dans ce chapitre.

Pour séparer les microbes à l'aide des milieux solides, on peut les répartir :

Ou bien *dans les milieux préalablement liquéfiés*. On s'adresse d'ordinaire à la gélatine, qui est plus favorable aux saprophytes qu'aux pathogènes. Aussi ces procédés sont-ils particulièrement indiqués *pour l'étude des milieux extérieurs* (eaux, etc.) ;

Ou bien, *à la surface des milieux*, en opérant soit *par épuisement*, soit *par dilution*. L'isolement en surface est réalisé à l'aide des milieux à base de gélose (gélose ordinaire, sang gélosé, etc.), ou de sérum coagulé ; il convient particulièrement à la *recherche des microbes pathogènes*.

A. **Isolement à l'aide des milieux solides préalablement liquéfiés.** — Le milieu solide est liquéfié au préalable. A ce milieu liquéfié on incorpore le produit à analyser, pur ou dilué ; on mélange ; on laisse refroidir et on porte à l'étuve après solidification. Chaque microbe est alors enrobé dans le milieu ; il donne naissance à une colonie, qui doit être séparée des voisines si la plaque est bonne.

On opère par *dilutions successives*, de telle sorte que les ensemencements sont de moins en moins riches. Ces dilutions successives sont presque toujours nécessaires, car, le nombre de germes renfermés dans le produit à analyser étant inconnu, un seul ensemencement courrait chance d'être ou trop pauvre, ou trop abondant.

Les milieux utilisables sont la gélatine et la gélose. La gélatine est le plus communément employée.

Avantages et inconvénients de la gélatine. — La gélatine, liquide à température relativement basse, est facilement maniable ; elle donne naissance à des colonies présentant souvent des caractères différentiels nettement tranchés. — Par contre, elle ne supporte pas la température eugénésique des microbes pathogènes, de telle sorte que beaucoup de ces derniers ne s'y développent que mal ou pas du tout ; pour la même raison, elle est difficilement utilisable en été et dans les pays chauds ; le développement est assez lent et demande plusieurs jours ; elle est liquéfiée par certaines espèces, ce qui gêne ou empêche l'observation.

Avantages et inconvénients de la gélose. — La gélose supporte bien la température de 37°. Aussi se prête-t-elle au développement de la plupart des pathogènes. — Mais, solide à température relativement haute — elle fond à 70° et se maintient en surfusion jusque vers 41° — elle est moins facilement maniable par le procédé actuel ; on s'adresse plutôt à d'autres procédés (Voy. ci-dessous, B et C).

1° ***Ensemencement en gélatine, en boîtes de Petri.*** — *Bon procédé.* — Préparer des boîtes de Petri et des pipettes stériles.

a. Faire fondre (bain-marie, étuve) trois tubes de gélatine de 10 centimètres cubes ; maintenir vers 30° à 35°.

La gélatine doit être assez refroidie pour que la température ne porte pas atteinte à la vitalité des germes qu'on recherche.

b. En prenant les précautions indiquées plus haut (p. 159), ensemencer un tube de gélatine, I, avec le produit à analyser. Mélanger.

Pour mélanger : incliner le tube, très fortement — sans mouiller le

bouchon — puis ramener à la verticale ; répéter cinq ou six fois de suite. Rouler alors le tube entre les deux mains, en position verticale. Incliner à nouveau, rouler. — Ne jamais agiter comme on le fait en chimie (en secouant), sans quoi le milieu serait encombré de bulles d'air.

c. Avec une pipette à effilure assez large, prélever un peu de gélatine du tube I ; répartir III à V gouttes dans le tube II. Mélanger.

d. Prélever un peu de gélatine du tube II ; répartir III à V gouttes dans le tube III. Mélanger.

On prépare ainsi trois mélanges à titres décroissants ; avec V gouttes d'une pipette au cinquantième de centimètre cube (calibre habituel) et 10 centimètres cubes de gélatine par tube, le mélange le plus riche (tube I) est dilué au centième dans le tube II, au dix-millième dans le tube III. Si la semence est déjà diluée au cinq-centième dans le tube I, elle sera diluée au cinq-millionième dans le tube III.

e. Soulever légèrement le couvercle d'une boîte de Petri. Déboucher le tube de gélatine I, flamber l'orifice ; couler la gélatine dans la boîte. Incliner la boîte en divers sens, de manière à répartir uniformément.

Il faut aller *très vite* dans la première partie de ce temps : laisser le moins longtemps possible la boîte ouverte à l'extérieur, exposée aux contaminations atmosphériques.

Couler de même, dans une deuxième boîte de Petri, le tube II ; dans une troisième, le tube III.

f. Placer les trois boîtes, horizontalement, au frais, pour refroidir et solidifier. Porter ensuite à l'étuve en gélatine, à 20°-22° ; à défaut d'étuve, laisser à la température ambiante.

Pour refroidir, on peut se contenter de poser les boîtes sur une surface froide : plaque de verre, revêtement d'émail, papier-filtre mouillé.

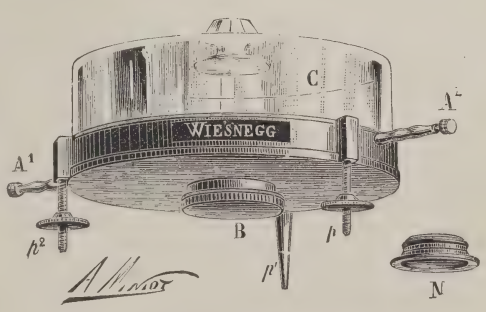

Fig. 85. — Table refroidissante et chauffante.

On gagne du temps en posant sur la *table refroidissante* (fig. 85) maintenue bien horizontale. La température de la platine est réglée par l'eau, circulant de A^1 à A^2 ; on peut en outre introduire de la glace en dévissant B. La platine peut être chauffante, pour d'autres usages.

g. Surveiller tous les jours la marche de la culture, en notant la rapidité de développement des colonies, leur aspect (examen à l'œil nu et à un faible grossissement, loupe ou microscope) ; repiquer les colonies bien isolées (bouillon, gélose) et étudier ensuite plus complètement les cultures obtenues.

Suivant la richesse microbienne de la semence, les colonies seront suffisamment isolées dans l'une ou l'autre des trois boîtes.

2° ***Ensemencement en gélose fondue, en boîtes de Petri.*** — La gélose faisant prise à une température assez élevée, il faut opérer avec soin pour éviter d'une part une solidification trop rapide, d'autre part un ensemencement à haute température, nuisible aux microbes.

Opérer comme pour la gélatine, sauf des modifications de détail :

a. Faire fondre trois tubes de gélose au bain-marie, à l'ébullition ; laisser refroidir vers 44°.

b, *c*, *d*. Comme ci-dessus ; opérer *très rapidement* : replacer les tubes au bain-marie dans l'intervalle des opérations.

e. Couler la gélose en boîte de Petri.

f. Porter à l'étuve à 37°, *couvercle en bas.*

On place le couvercle en bas, afin que l'eau évaporée se condense non pas à la surface du milieu, mais sur le couvercle.

B. **Isolement à la surface des milieux solides par épuisement.** — Le principe est simple : la semence est chargée sur un fil de platine, qu'on promène sur les milieux. En raclant la surface, le fil abandonne peu à peu les microbes dont il est chargé ; les stries ainsi faites, très riches au début, s'appauvrissent peu à peu, et finalement ne donnent plus que des colonies rares, séparées les unes des autres.

1° ***Procédé des tubes.*** — *Bon procédé.* — Indiqué d'abord pour les produits suspects de diphtérie (ensemencement sur sérum coagulé) ; ce procédé sera utilisé avec profit pour l'ensemencement de la plupart des produits pathologiques, en ayant soin de faire les cultures sur un milieu plus favorable aux pathogènes qu'aux saprophytes : gélose, sang gélosé, gélose-ascite, gélose au blanc d'œuf alcalin, etc. La technique sera la même dans les différents cas.

a. Prélever le produit suspect sur fil de platine fort.

b. Ensemencer un premier tube ; commencer par le fond, ramener vers l'orifice en badigeonnant toute la surface.

c. Sans recharger le fil, opérer de même pour un deuxième tube.

d. Toujours sans recharger le fil, ensemencer un troisième tube.

e. Mettre les tubes à l'étuve, suivre la culture.

2° ***Procédé des plaques.*** — Indiqué spécialement pour isoler, sur milieux imparfaitement électifs, des microbes en quelque sorte noyés au milieu d'autres microbes : recherche du méningocoque

dans le mucus rhino-pharyngé (gélose-ascite ou gélose au blanc d'œuf alcalin), recherche du bacille typhique dans les excreta (milieu d'Endo et similaires), etc.

Indiqué également pour isoler une à une chacune des espèces aérobies contenues dans un produit pathologique.

Liquéfier le milieu, verser en boîtes de Petri, laisser refroidir, ensemencer comme il a été indiqué plus haut (p. 161, ensemencement par étalement). Porter à l'étuve, couvercle en bas.

C. **Isolement à la surface des milieux solides par dilution.** — 1° *Procédé expéditif.* — Le procédé suivant, expéditif, suffit dans la plupart des cas. Les dilutions sont faites dans les tubes mêmes qui doivent servir à la culture.

a. Préparer trois ou quatre grands tubes de gélose, présentant une quantité appréciable d'eau de condensation.

Si les tubes sont secs, on ajoutera 0cc,5 à 1 centimètre cube d'eau stérile.

b. Porter la semence dans l'eau de condensation du tube I. Boucher, Incliner à cinq ou six reprises; l'eau doit lécher toute la surface.

c. Plonger le fil de platine droit dans le liquide du tube I ; porter dans le tube II, le traiter comme en *b*.

d. Porter dans l'eau du tube II l'extrémité du fil de platine ; ensemencer le tube III, traiter comme en *b*.

Si la semence est très riche, ensemencer un quatrième tube.

e. Porter à l'étuve. Maintenir en position à peu près verticale, tant à l'étuve que lors des examens ultérieurs.

2° *Procédé de Veillon. — Epuisement avec dilution.* — *a.* Préparer quatre grands tubes de gélose, comme pour le procédé ci-dessus.

b. Charger la semence sur fil de platine droit.

c. Porter le fil dans l'eau d'un premier tube ; sans recharger, porter le fil dans un deuxième tube et continuer ainsi jusqu'au dernier.

d. Incliner les tubes, de manière que l'eau vienne lécher toute la surface et y disséminer les germes. Redresser, porter à l'étuve.

Remarque. — On peut substituer à la gélose ordinaire la gélose additionnée de *sang*, d'*ascite*, de *blanc d'œuf alcalin*, de *sérum*, dans l'un ou l'autre des deux procédés qui précèdent.

D. **Observation ultérieure des milieux d'isolement.** — Quel que soit le procédé employé, les milieux ensemencés seront examinés au moins une fois par jour. On notera les caractères des différentes colonies ; s'il y a lieu, par exemple lorsqu'on étudie un produit pathologique, on procédera à l'examen microscopique et au repiquage de toutes les colonies qui paraissent différentes les unes des autres. Dans ces dernières opérations, il sera nécessaire de se conformer aux règles indiquées à propos de chacune d'elles.

II. — MÉTHODES SPÉCIALES.

Artifices de séparation. — Ils sont nombreux, variables suivant les espèces.

Résistance à la chaleur. — Certains microbes, spécialement ceux qui donnent des spores, résistent quelque temps à l'action de températures très élevées.

C'est ainsi que le *B. subtilis*, par exemple, résiste très bien à l'ébullition prolongée pendant dix minutes : comme il est répandu à peu près partout, il suffira pour l'obtenir de faire bouillir une infusion de foin, qu'on ensemencera ensuite : le *B. subtilis* poussera seul ; d'où son nom de *Bacille du foin*. On isolerait de même de la pomme de terre le *B. mesentericus*.

Quelques microbes pathogènes, spécialement des anaérobies (Vibrion septique, tétanos) se prêtent à ce mode de séparation. On pourra le mettre en pratique de la manière suivante :

a. Diluer la semence en milieu liquide. Aspirer dans la partie capillaire d'une pipette ; fermer aux deux bouts.

b. Porter dans l'eau à 95° ; maintenir pendant deux minutes.

Ce temps peut varier suivant les espèces : cinq minutes à 85° pour le charbon sporulé ; quinze minutes d'ébullition pour le *B. mesentericus*, etc.

c. Retirer le tube capillaire. Sécher une extrémité, la flamber et casser aseptiquement avec une pince.

d. Prélever le liquide à l'aide d'une pipette très effilée.

e. Ensemencer dans un milieu approprié.

Culture à températures dysgénésiques. — On sait que les microbes peuvent se développer dans des conditions thermiques variables ; leur faculté de végétation s'arrête à une température déterminée, qui peut être suffisante pour permettre l'isolement.

C'est ainsi que le Colibacille et le B. typhique se développent encore à 46° (Chantemesse et Widal), alors que la plupart des germes ne donnent plus de culture au delà de 41° ou 42°. Si l'on ensemence à 43° un produit renfermant du Colibacille, la culture sera positive ; mais rarement on la trouvera pure : car, si une température de 43° empêche le développement de la plupart des germes, elle ne saurait toutefois les détruire. Un repiquage de cette première culture sur d'autres milieux donnerait un mélange de Colibacilles et d'autres bactéries. Aussi est-il préférable de recourir aux *cultures fractionnées* : partant de la première culture, on fait un deuxième ensemencement, qui sera porté également à 43° ; au besoin, on con-

tinuera les cultures successives, jusqu'à obtention d'une culture absolument pure.

Certains microbes, les *bactéries thermophiles*, se développent à des températures élevées, 65°-70°, que ne supportent pas les autres espèces ; il est très facile dès lors de les isoler, par culture à 70° environ.

Séparation par filtration. — Les microbes mobiles peuvent traverser une paroi filtrante avec plus ou moins de rapidité. Le procédé sera décrit plus loin (Voy. chap. XXXI).

Milieux de culture spéciaux. — L'idéal pour l'isolement des microbes serait de pouvoir offrir à chacun d'eux un milieu de composition fixe, où il se développe seul, à l'exclusion de tous les autres. Il est malheureusement bien difficile d'y parvenir ; seul jusqu'ici le milieu de Raulin répond à ce but : *Aspergillus niger* s'y développe à l'exclusion de toute autre bactérie. A défaut de semblables milieux, on se contente d'une électivité relative.

Le plus souvent, on ajoute aux milieux ordinaires des substances qui empêchent la culture de la plupart des microbes, sans gêner le microbe qu'on veut chercher. C'est ainsi que, pour la recherche du bacille typhique et des bacilles voisins, on s'adresse aux *acides* dilués (généralement l'acide phénique) ; à certaines *substances colorantes* : fuchsine, vert malachite ; à la caféine ; etc. De même, les levures et moisissures se développent de préférence sur *milieux acides*.

Certains milieux, bien que peu nutritifs, se prêtent à l'isolement des pathogènes. Ainsi le pepto-gélo-sel est couramment employé pour la recherche du Vibrion cholérique ; le sérum coagulé, pour le diagnostic bactériologique de la diphtérie.

Inversement, on peut isoler des microbes un peu délicats à l'aide de milieux très nutritifs : le Méningocoque cultive facilement sur gélose-ascite ou gélose à l'œuf alcalin, le Streptocoque sur bouillon-sérum, etc.

Le mode d'emploi de ces différents milieux sera indiqué ailleurs.

Inoculation aux animaux. — Les animaux sont tellement sensibles à certains microbes qu'ils les sélectionnent, quand on leur inocule un produit même impur. On retrouve alors ces microbes seuls, dans les organes ou les lésions ; les autres microbes ont disparu. C'est ainsi que le cobaye se prête à l'isolement, par inoculation, du bacille tuberculeux, du bacille pesteux, du Vibrion septique ; la souris et le lapin, à l'isolement du Pneumocoque ; le lapin, à l'isolement du Streptocoque, etc. Les très nombreuses applications de cette méthode seront signalées à propos de chaque microbe.

CHAPITRE XI

CULTURE ET ISOLEMENT DES ANAÉROBIES

Les microbes anaérobies ne se développent qu'en l'absence d'oxygène libre. Pour les cultiver, il est donc nécessaire de priver les milieux d'oxygène et de les maintenir tels pendant toute la durée de la culture. Des manipulations et des dispositifs spéciaux sont nécessaires pour y parvenir.

En réalité, il est probable que nous n'arrivons jamais à l'*anaérobiose absolue*, c'est-à-dire que les procédés les meilleurs laissent toujours dans les milieux des traces d'oxygène; mais l'anaérobiose relative qu'on obtient suffit pour permettre le développement des anaérobies, tout en entravant la culture des aérobies stricts.

La technique étant un peu spéciale, il est bon de s'y habituer. On obtient facilement un microbe d'étude. En inoculant un cobaye sous la peau avec une émulsion de terre de jardin ou de vase, chauffée deux minutes à 100°, l'animal succombe généralement à une infection par le *Vibrion septique*, qu'on pourra récolter de la sérosité péritonéale.

Nous étudierons successivement : 1° les procédés d'éviction de l'oxygène ; 2° les procédés de culture ; 3° les méthodes d'isolement.

I. — PROCÉDÉS D'ÉVICTION DE L'OXYGÈNE.

On fait disparaître l'oxygène des milieux de culture à l'aide de plusieurs procédés, qu'on peut ramener à quatre : ébullition ; substitution de gaz inertes ; extraction par le vide ; fixation par réduction.

A. — Ébullition.

L'ébullition, prolongée pendant quinze à vingt minutes, chasse la plus grande partie de l'air dissous dans les milieux. Il faut ensuite s'opposer à la redissolution ultérieure d'oxygène : pour cela, refroidir rapidement et empêcher l'absorption d'oxygène par l'un ou l'autre des artifices indiqués plus loin.

Au sortir de l'autoclave, les milieux sont également assez pauvres en oxygène pour permettre les cultures anaérobies.

B. — Substitution des gaz inertes.

Les anaérobies peuvent se développer en présence de certains gaz qu'on dit *inertes*, parce qu'ils n'exercent sur eux aucune action. Un courant de gaz inerte, passant dans les récipients et barbotant dans les milieux, entraîne l'air (avec l'oxygène) qui y était contenu.

La méthode de substitution n'est plus guère employée seule ; on lui demande seulement de compléter les effets du vide.

On a proposé comme gaz inertes l'*hydrogène*, l'*azote*, l'*acide carbonique*, le *gaz d'éclairage*, l'*acétylène*. L'azote est difficile à préparer ; l'acide carbonique est toxique. Le gaz d'éclairage gène certaines bactéries, mais certaines n'en sont pas incommodées : on pourra se servir du gaz pour étudier ces dernières.

La plupart du temps, on emploie l'hydrogène, non toxique et facile à préparer. Chacun peut aménager l'appareil de Roux.

Appareil de Roux pour produire l'hydrogène. — L'appareil comprend deux flacons à deux tubulures reliés comme l'indique la figure 86. Au fond du flacon A, du verre (en baguettes ou en morceaux) ; au-dessus de ce dernier, des rognures de zinc. En B, de l'acide sulfurique au sixième.

Pour préparer l'acide sulfurique au sixième : verser peu à peu, avec beaucoup de précaution, lentement, de l'acide sulfurique pur dans cinq fois son poids d'eau.

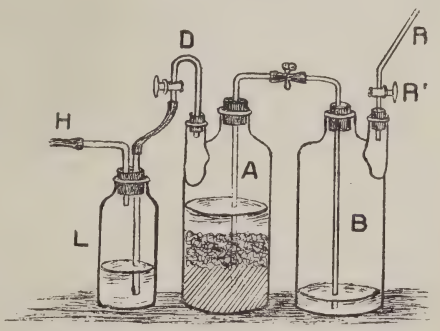

Fig. 86. — Appareil à hydrogène de Roux.

Au contact du zinc, l'acide sulfurique donne naissance à de l'hydrogène, qui se dégage par le tube D. Au flacon A fait suite un petit flacon laveur, L, destiné à retenir l'oxygène ; y verser la solution indiquée page 177.

Fonctionnement. — 1° Comprimer l'air en B (souffler par R), robinets R′ et D ouverts. Le liquide passe en A.

2° Fermer D. L'hydrogène formé en espace clos fait pression et refoule le liquide vers B. Le dégagement s'arrête.

3° Ouvrir D. Laisser échapper le gaz. Comprimer par R ; recommencer l'opération précédente.

Après trois ou quatre manœuvres semblables, le flacon A est purgé d'air ; il donnera de l'hydrogène pur.

Néanmoins, il est bon de s'assurer que le courant n'est pas mélangé d'oxygène. Pour cela, faire barboter dans une solution d'indigo blanc ; s'il y a de l'oxygène, la solution devient bleue.

4° Une fois le courant débarrassé d'oxygène, raccorder le tube H à l'appareil à vide (Voy. ci-dessous).

5° L'opération terminée, fermer le robinet D. Comme précédemment, l'hydrogène formé refoule le liquide en B ; la réaction cesse.

L'appareil est purgé d'air. Dans les opérations ultérieures, il suffira, pour obtenir de l'hydrogène pur, de faire passer le liquide en A.

Variante. — Un autre modèle (fig. 87), plus ancien, facile à improviser, diffère du précédent en ce que le tube de jonction des deux flacons est

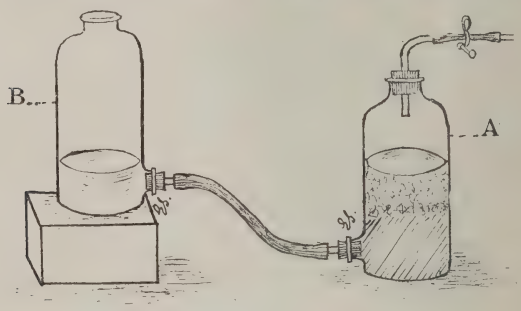

Fig. 87. — Appareil générateur d hydrogène.

placé à leur partie inférieure ; ce tube est en caoutchouc, ce qui est nécessaire pour permettre les mouvements de B. Pour faire fonctionner : surélever B ; le liquide passe en A. Le caoutchouc s'use à la longue.

C. — Extraction par le vide.

On peut s'adresser à la trompe à eau ou à la pompe à mercure.

Remarques. — 1° Employer des récipients de culture à parois résistantes, capables de supporter la pression atmosphérique.

2° Faire les raccords avec des tubes de caoutchouc épais (tube à vide ou tube Martin, ce dernier plus souple). — Pour faciliter l'ajustage des tubes de verre au caoutchouc, les effiler un peu à leur extrémité. Au besoin, mouiller légèrement cette extrémité.

3° Après avoir fait le vide dans les récipients, assurer une fermeture hermétique, pour éviter toute rentrée d'air.

4° Les récipients ne seront pas remplis au delà des deux tiers.

Trompe à eau. — C'est l'appareil d'usage courant dans les laboratoires.

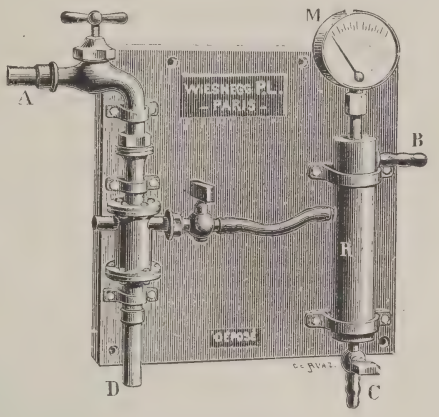

Fig. 88. — Trompe à eau.

Il exige une pression de 8 à 12 mètres d'eau; si la pression dans la canalisation est trop faible, on réalisera une installation de fortune : surélever le réservoir d'eau, ou inversement faire descendre très bas (en sous-sol) le tuyau de chute. Toute trompe à eau doit comporter comme annexes :

Un *manomètre* (à mercure ou métallique) ;

Un *réservoir de sûreté*, pour éviter les retours d'eau dans les récipients de culture (ces retours se produisent surtout quand la pression de l'eau baisse inopinément : le vide du récipient fait alors aspiration). Dans nombre de modèles, ce réservoir fait partie de l'appareil (fig. 88). S'il n'existe pas, on l'improvisera à l'aide d'un flacon à deux tubulures (fig. 89).

Il est utile d'y adjoindre un *branchement* terminal *en T :* une branche va à la trompe, une autre au récipient de culture, la troisième à l'appareil producteur d'hydrogène (Voy. ci-dessous).

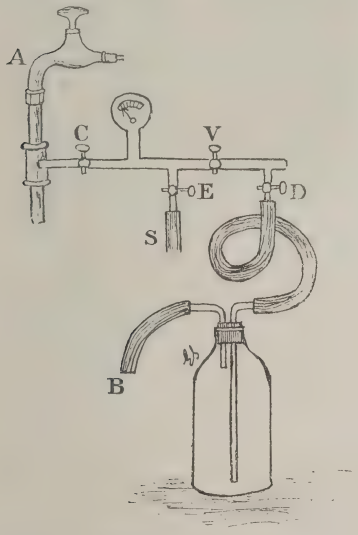

Fig. 89. — Dispositif pour extraction de l'air par le vide.

La trompe à eau permet d'obtenir : le vide ; ou le vide avec lavage à l'hydrogène.

Production du vide. — 1° Adapter le récipient de culture à l'extrémité B. — Ouvrir le robinet d'eau A (fig. 89.)

2° Ouvrir les robinets : V, à fond ; C, progressivement, en suivant des yeux l'aiguille du manomètre et le récipient de culture.

Le vide se fait dans le récipient ; l'aiguille du manomètre s'élève ; quand elle s'immobilise, le vide est à son maximum. Maintenir l'aspiration pendant quelques minutes.

3° En continuant l'aspiration, sceller à la flamme le récipient de culture. Fermer C, puis A. Si, pour une raison quelconque, une aspiration en cours devait être interrompue, se hâter de fermer C.

Variante. — Vide avec ébullition. — Quand le milieu est liquide, on peut le faire bouillir, la température d'ébullition étant très basse, par suite du peu de pression. Dans ce but, opérer comme ci-dessus ; en outre, porter le récipient de culture à 35°-40° : pour une pipette, il suffit de prendre à pleine main ; ou bien lécher prudemment les parois avec une flamme.

Les bulles formées, aspirées par la trompe, montent vers l'orifice du récipient et tendent à s'échapper. Pour y obvier, chauffer légèrement le récipient, à quelques centimètres au-dessus de la surface du liquide. Les bulles viennent crever sur la paroi chauffée.

Vide avec lavage à l'hydrogène. — Indiqué pour les cultures sur milieux solides, ou sur milieux liquides en grande masse.

1° Adapter le récipient de culture à B ; adapter le tube de dégagement d'hydrogène (Voy. ci-dessus) au tube S. Ouvrir A.

2° Comme ci-dessus (Voy. *Production du vide*), E fermé.

3° Une fois le vide réalisé, fermer C. Ouvrir E. L'hydrogène passe dans l'appareil ; l'aiguille du manomètre baisse jusqu'à zéro.

4° Recommencer le temps 2° (aspiration), puis le temps 3° (lavage) ; répéter les mêmes opérations, chacune trois fois.

5° Sceller comme ci-dessus, soit dans le vide (c'est-à-dire C et V ouverts, E fermé) soit dans l'hydrogène (E et V ouverts, C fermé), suivant les indications.

Pompe à mercure. — La pompe à mercure est moins employée que la trompe à eau, parce que plus fragile et plus onéreuse ; elle permet cependant d'obtenir un vide plus parfait. Nous ne pouvons insister sur le détail du fonctionnement, qu'on trouvera dans les traités de physique ; pour les applications bactériologiques, on suivra, en outre, les indications données à propos de la trompe à eau.

D. — Emploi de corps réducteurs.

Les corps réducteurs sont de plusieurs ordres :

1° Les uns sont toxiques pour les microbes ; il est, par suite, impossible de les incorporer aux milieux nutritifs. On ne peut les

employer que *pour absorber l'oxygène de l'atmosphère ambiante*, dans un espace confiné où l'on disposera les récipients de culture.

On emploie généralement, dans ce but, la solution suivante :

Acide pyrogallique	1 gramme
Potasse caustique	1 —
Eau distillée	10 centim. cubes.

Pour le dispositif, voir plus loin.

Sellards substitue à la solution précédente le phosphore.

2° D'autres réducteurs, ne gênant pas les cultures, *sont incorporés aux milieux nutritifs*. Nous rangeons dans ce groupe certains réducteurs chimiques, des réducteurs tissulaires (tissus) et des réducteurs microbiens (microbes aérobies), bien que le mode d'action des tissus et des microbes soit encore un peu discuté.

Réducteurs chimiques. — Ce sont les plus employés. Couramment on s'adresse à la glucose (Liborius, Veillon) On peut employer également le sulfo-indigotate de soude à 0,1 p. 100 (Salomonsen), le sulfure de calcium desséché (M. Nicolle, Césari et Alleau) ; le sulfate de zinc ammoniacal (Liefmann), la mousse de platine (Pfuhl) auraient des propriétés analogues.

Réducteurs tissulaires. — Tarozzi a constaté qu'il suffit d'ajouter aux milieux ordinaires (bouillon, gélose) un fragment d'organe frais pour les rendre propices au développement des anaérobies.

Des fragments de foie, de rate, de rein, de ganglion lymphatique peuvent être utilisés avec succès. L'addition de pomme de terre, même stérilisée à 120°, à raison de 1 gramme pour 10 centimètres cubes de bouillon (Wrozek), de même que l'addition de moelle de sureau, de graines de légumineuses (Guillemot et M^lle^ Syezewinska), de macérations d'organes desséchées et pulvérisées (Baldini), confère au milieu les mêmes propriétés.

Toutefois, d'après Jungano et Distaso, les milieux de Tarozzi et similaires sont inférieurs aux milieux habituellement employés ; la vitalité des microbes est moindre et les espèces fragiles s'y développent à peine.

Réducteurs microbiens. — Les aérobies stricts absorbent l'oxygène des milieux, et, par suite, peuvent les rendre aptes à la culture des anaérobies. Il suffira d'ensemencer en surface le microbe aérobie et, en profondeur, le microbe anaérobie (Voy. plus loin).

II. — PROCÉDÉS DE CULTURE DES ANAÉROBIES.

La nécessité d'employer l'un ou l'autre des procédés précédents pour évincer l'oxygène oblige à adapter les récipients de culture à des conditions toutes spéciales. L'ingéniosité des auteurs s'est donné libre carrière pour doter la technique de dispositifs variés. En pratique, dans la plupart

des laboratoires, on se contente généralement, pour les milieux liquides, de la pipette de Roux, ou du flacon à deux tubulures (suivant la quantité de milieu), et pour les milieux solides, des procédés de Veillon (gélose) ou du tube à essai (gélatine). Il est bon néanmoins de pouvoir au besoin varier la technique.

La plupart des méthodes sont *mixtes*, c'est-à-dire qu'elles combinent plusieurs modes d'éviction de l'oxygène.

A. — Dispositifs applicables indifféremment aux milieux solides et aux milieux liquides.

On peut disposer les tubes à culture dans une atmosphère confinée ; on enlève ensuite l'oxygène de cette dernière.

Il est alors inutile de donner aux tubes une disposition spéciale ; on ensemencera sur les tubes décrits plus haut pour les aérobies.

Ces appareils sont peu employés.

Cloche à vide, *étuve à vide*, etc. — On peut placer les tubes ou boîtes dans une *cloche à vide* ordinaire (fig. 90) ; transporter celle-ci à l'étuve, faire le vide dans la cloche. Au même but sert la cloche Martin. — Diverses *étuves* sont construites pour permettre de faire le vide. — L'évaporation étant très active dans le vide, il est utile de placer au fond des étuves un large récipient contenant de l'eau, ou plutôt la solution réductrice indiquée ci-dessus.

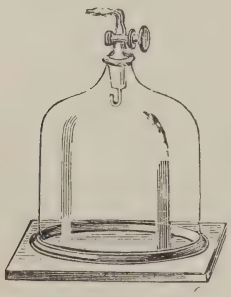

Fig. 90. — Cloche à vide.

Procédé de Buchner. — Le dispositif de Buchner (fig. 91) comporte un tube à essai, un autre tube plus grand, un support. On peut très bien se contenter d'un petit tube à essai disposé dans un grand tube à pomme de terre (fig. 92).

Fig. 91. — Tube de Buchner.

Fig. 92. — Dispositif de Buchner modifié.

a. Ensemencer le tube de culture (bouillon, gélose, etc.) ;

b. Verser au fond du grand tube quelques centimètres cubes de la solution d'acide pyrogallique (Voy. p. 176), préparée *immédiatement* avant l'emploi. Il faut environ 1 gramme d'acide pyrogallique pour absorber l'oxygène contenu dans 100 centimètres cubes d'air. Mais il est prudent d'introduire une dose 4 fois supérieure.

c. Fermer le grand tube à l'aide d'un bouchon de caoutchouc, luté à la cire.

Opérer très vite, pour éviter l'oxydation prématurée du réducteur.

Agiter de temps à autre pour favoriser l'absorption de l'oxygène.

Ce procédé donne une anaérobiose suffisante ; il a l'avantage de pouvoir être improvisé sans difficulté.

Remarque. — On peut substituer au grand tube un autre récipient plus vaste fermant hermétiquement (cloche à vide, par exemple).

B. — Dispositifs pour milieux liquides.

Pipette de Roux. — *Procédé de choix*. — La pipette de Roux pour anaérobies (fig. 93) comporte une partie renflée, terminée d'un côté par une effilure de pipette, de l'autre par un tube de verre portant deux étranglements; entre ces derniers, on interpose un tampon de coton.

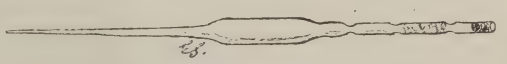

Fig. 93 — Pipette de Roux pour anaérobies.

On peut fabriquer soi-même des pipettes analogues.

Mode d'emploi. — *a*. Ensemencer un tube de bouillon.

b. Flamber l'effilure de la pipette, casser, flamber à nouveau.

c. Aspirer le bouillon dans la pipette ; remplir à moitié ou aux deux tiers. Fermer l'effilure à la flamme.

d. Mettre en communication avec la trompe à eau, faire le vide avec ébullition dans le vide (Voy. p. 175).

e. Sous le vide, fermer à la flamme la pipette, à l'étranglement supérieur. Au besoin, consolider les extrémités avec la cire Golaz.

Une fois la culture obtenue, si l'on veut *faire un prélèvement*, on opérera comme suit :

α. Donner un trait de lime, à la partie supérieure du tampon; ouvrir.

Au moment où on ouvre le tube, diriger l'orifice de telle façon que la projection, possible, du liquide ne soit pas dangereuse. Cette projection est due à ce que la culture a donné lieu à un dégagement gazeux extrêmement abondant ; elle « saute » alors, comme une bouteille à champagne. C'est d'ailleurs tout à fait exceptionnel. Ordinairement les gaz formés s'échappent sans incident au moment de l'ouverture.

β. Enlever le tampon. Prélever aseptiquement, avec une pipette.

On peut ensuite continuer la culture dans un vide relatif, en opérant comme suit. Chauffer doucement l'espace libre au-dessus

du liquide. L'air chauffé se dilate et sort en grande partie de l'ampoule. Fermer à la flamme.

Variante. — Pour des cultures d'essai, il suffit de très peu de liquide; on pourra alors employer une pipette ordinaire, adaptée à la technique précédente. Étrangler la pipette au-dessus et au-dessous du bouchon. Opérer ensuite comme pour la pipette de Roux.

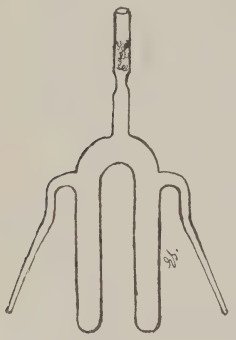

Fig. 94. — Tube double de Pasteur.

Tube double de Pasteur (fig. 94). — Très employé il y a quelques années, il permet de faire deux cultures successives. L'appareil a la forme d'un U renversé, portant une effilure sur chaque face latérale et, au fond, un tube. Préparer d'abord le tube terminal (tampon d'ouate entre deux étranglements). Les effilures sont généralement très rapprochées de l'U; il faut les écarter un peu, en coudant à la flamme. Fermer les effilures, stériliser.

Mode d'emploi. — *a.* Casser la pointe d'une effilure, aspirer du bouillon stérile jusqu'à remplir le tiers de la branche correspondante; fermer l'effilure.

b. Ensemencer un tube de bouillon. Casser l'autre effilure à la pointe, aspirer le bouillon ensemencé, remplir au tiers la branche correspondante, fermer.

c. Mettre le tube en communication avec la trompe à eau. Faire le vide avec lavage à l'hydrogène.

d. L'opération terminée, fermer au-dessus du tampon. Mettre à l'étuve, verticalement.

Pour faire une deuxième culture, quand la première a poussé : incliner l'appareil de manière qu'une partie du liquide passe dans l'autre branche.

Tube de Pasteur simple. — C'est le tube précédent, réduit à une branche.

Tube de Lacomme (fig. 95). — Il s'emploie comme le tube double de Pasteur, coûte moins cher.

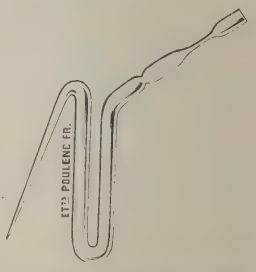

Fig. 95. — Tube de Lacomme.

Culture en flacon (dispositif de Würtz). — *Procédé de choix.* — Ce procédé est indiqué pour cultures en grande masse.

Préparer un flacon de 1 à 2 litres (fig. 96), muni d'un bouchon de caoutchouc à deux trous. Remplir de bouillon à moitié ou aux deux tiers. Deux tubes traversent le bouchon : l'un, A, plonge dans le flacon jusque près du fond ; il se termine à l'extérieur par une effilure coudée; l'autre, B, affleure sous le bouchon, sans plonger, et se ter-

mine au dehors par une extrémité coudée à angle droit, portant un tampon de coton entre deux étranglements.

Stériliser à l'autoclave, A scellé. Après refroidissement, sécher le tampon d'ouate. Couvrir de cire Golaz les rainures du bouchon, pour assurer l'étanchéité.

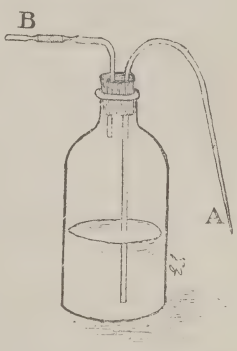

Fig. 96. — Culture en flacon (anaérobies).

Mode d'emploi. — Préparer la semence.

a. Flamber, puis casser la pointe de A; ensemencer le ballon en plongeant la pointe dans la semence, tout en aspirant par B. Sceller l'effilure à la flamme;

b. Mettre B en communication avec la trompe à eau; faire le vide avec lavage d'hydrogène (Voy. p. 176);

c. Sceller dans l'hydrogène l'étranglement extérieur de B.

Pour opérer un prélèvement, ouvrir l'extrémité de B; même remarque et même précaution que ci-dessus, p. 179, α. Flamber et casser l'extrémité de A. Souffler par B, recueillir le liquide dans un récipient stérile.

Cultures en tubes profonds, avec cubes d'albumine et sulfure de calcium. — *Procédé recommandé.* — Ce dispositif, très simple, se prête à la culture de presque tous les anaérobies.

Le bouillon est réparti en tubes, en grande profondeur; la hauteur de la colonne liquide doit atteindre 10 centimètres au moins.

Au fond du tube, on dispose deux ou trois « cubes d'albumine » de un demi-centimètre cube environ. — L'albumine employée est le blanc d'œuf, cuit dur, et coupé en cubes.

Les tubes ainsi préparés sont stérilisés comme d'ordinaire.

Avant l'emploi, faire bouillir ou passer à l'autoclave. Refroidir rapidement.

Au moment de l'emploi, avant ou après l'ensemencement, prélever sur une spatule de platine un peu de sulfure de calcium, stérilisé au préalable à sec. Le tube étant maintenu verticalement, précipiter le sulfure dans le liquide.

Culture sous l'huile de vaseline (*Legros*). — Répartir le bouillon en tubes sur une grande profondeur. Verser au-dessus de l'huile de vaseline sur 15 à 20 millimètres de hauteur. Stériliser.

Ensemencer à la pipette.

Culture « en tube cacheté » sous lanoline (Rosenthal). — A l'huile de vaseline on peut substituer la lanoline, fusible à 42°.

Préparer comme dans le procédé précédent ; au moment de la préparation, chauffer la lanoline pour la rendre liquide. Liquéfier de même, en chauffant doucement, le bouchon de lanoline au moment des ensemencements et des prélèvements.

Si l'on prévoit un fort dégagement gazeux, il sera prudent d'étrangler un peu le tube au préalable, au niveau qui doit être occupé par la lanoline.

Milieux de Tarozzi. — A un tube de bouillon ordinaire, ajouter un fragment d'organe (foie, etc.) recueilli aseptiquement. Ensemencer ensuite le milieu sans autre préparation.

C. — Dispositifs pour ensemencement des milieux liquides par piqûre.

Tube de Veillon. — *Procédé de choix.* — C'est une modification heureuse d'un procédé antérieur de Liborius.

a. Préparer de la gélose un peu faible, renfermant seulement 0,8 p. 100 de gélose sèche; additionner de glucose, 1,5 p. 100. Répartir en grands tubes, de telle sorte que le cylindre de gélose atteigne 7 à 8 centimètres de hauteur. Stériliser.

b. Faire bouillir les tubes au bain-marie ; maintenir l'ébullition pendant quinze à vingt minutes. Laisser solidifier.

c. Ensemencer par piqûre profonde ; l'aiguille doit presque toucher le fond.

La partie superficielle du cylindre fait tampon ; elle absorbe un peu d'oxygène, mais elle protège la couche profonde contre l'oxydation. Les anaérobies stricts commencent à pousser seulement à partir de 2 centimètres de la surface.

Variante. — Pour certaines espèces, on additionnera la gélose de sérum, après ébullition, quand la température sera descendue vers 45°.

On préparerait de même la gélatine glucosée.

Procédé du tube à essai profond (Gélatine). — Répartir la gélatine en grands tubes, sur une hauteur de 10 à 12 centimètres.

a. Au moment de l'emploi, faire bouillir pendant quinze à vingt minutes. Refroidir rapidement.

On mettra à fondre en même temps un tube de gélose.

b. Refroidir rapidement et solidifier la gélatine. Refroidir la gélose, maintenir liquide vers 45°.

c. Ensemencer la gélatine en piqûre profonde.

d. Verser à la surface de la gélatine quelques centimètres cubes de gélose. Refroidir très rapidement.

Le bouchon de gélose protège la gélatine contre l'oxydation.

Tube de Roux. — On peut utiliser pour piqûres le modèle de tube de Roux destiné aux stries (Voy. ci-dessous).

Fixation d'oxygène par un microbe aérobie (Roux). — *a* à *d*. Comme pour le deuxième procédé ci-dessus (procédé du tube à essai profond).

e. Ensemencer à la surface de la gélose un microbe aérobie strict (*B. subtilis* ou *B. mesentericus*).

Pour prélever la culture anaérobie : couper le tube de verre, à distance du bouchon de gélose.

D. — Dispositifs pour ensemencement des milieux solides en strie.

On peut utiliser le **dispositif de Buchner** (Voy. p. 178) ou l'un des suivants.

Tube de Roux (fig. 97). — Il présente la forme d'un tube à essai, surmonté d'un tube en T horizontal. Disposer un tampon de coton filtrant sur la branche horizontale. Remplir au tiers de gélatine, fermer l'extrémité supérieure, stériliser.

Au moment de l'emploi, s'assurer d'abord que le tampon de coton est sec. Sinon, sécher en chauffant.

a. Liquéfier la *gélatine*.

On peut employer la *gélose* : il faut alors maintenir dans un bain-marie très chaud jusqu'au temps *b* inclus.

b. Relier le tube A à la trompe à eau munie de l'appareil à hydrogène ; faire le vide avec rinçage à l'hydrogène.

c. L'appareil étant plein d'hydrogène, incliner le tube à culture, laisser refroidir pour faire prise. Attendre la solidification.

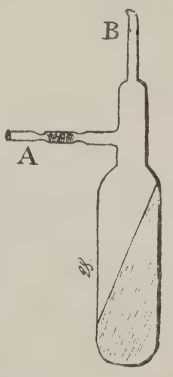

Fig. 97. — Tube de Roux, en T, pour anaérobies.

d. Ensemencer : ouvrir l'extrémité supérieure, B; ensemencer rapidement à l'aide d'un long fil de platine; sceller.

L'air ne rentre pas au moment de l'ouverture, parce que l'appareil est plein d'hydrogène, qui s'échappe au dehors à ce moment.

e. Faire le vide, laver à l'hydrogène ; sceller l'étranglement à la flamme, dans l'hydrogène.

Il vaut mieux faire les cultures en strie dans une atmosphère d'hydrogène, de manière à éviter autant que possible que le milieu ne se décolle de la paroi, sous l'influence du vide.

Dispositif extemporané. — On peut utiliser un simple tube à essai, à paroi résistante, fermé par un bouchon de caoutchouc traversé par deux tubes, le tout disposé comme l'indique la figure 98.

Répartir dans le tube de la gélose, quantité nécessaire pour obtenir ensuite une grande surface de gélose inclinée.

Opérer ensuite comme pour le tube de Roux ci-dessus ; le tube O sert à l'ensemencement ; le tube coudé est utilisé pour le vide et pour le rinçage à l'hydrogène.

Fig. 98. — Tube pour culture en strie (anaérobie).

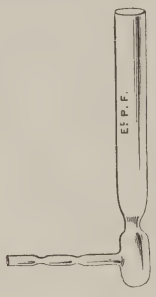

Fig. 99. — Tube pour culture anaérobie sur pomme de terre.

Remarque. — On peut employer également un bouchon muni d'un seul tube.

Le vide et le rinçage à l'hydrogène sont faits comme ci-dessus, gélose liquéfiée. Incliner la gélose, le tube étant plein d'hydrogène. Une fois la gélose bien prise, enlever le bouchon, ensemencer, replacer le bouchon. Faire le vide, puis laisser pénétrer l'hydrogène ; sceller.

Dispositif pour cultures sur pomme de terre. — Employer le tube de Roux pour culture anaérobie sur pomme de terre (fig. 99) ; disposer le milieu et stériliser comme d'habitude.

Pour l'emploi : ensemencer. Sceller le tube, dans la flamme, à son extrémité supérieure. Relier l'effilure latérale à la trompe à eau, faire le vide (avec ou sans rinçage) ; sceller l'effilure.

III. — ISOLEMENT DES ANAÉROBIES.

Comme pour les aérobies (p. 165), il existe des méthodes générales et des méthodes spéciales.

Les *méthodes spéciales* sont les mêmes que nous avons déjà décrites pour les aérobies ; il est donc inutile d'y revenir. Les plus employées sont l'isolement par la chaleur (tétanos) et l'inoculation aux animaux (Vibrion septique).

Les *méthodes générales* utilisent les cultures sur plaques ou les cultures en tubes.

A. — Isolement sur plaques.

Méthode ordinaire des plaques. — On peut employer la méthode ordinaire, telle qu'elle a été décrite précédemment (p. 166); après refroidissement, les plaques sont portées sous une cloche, fermant hermétiquement; placer également sous la cloche la solution réductrice indiquée page 177.

Procédé de Marino. — On dispose des boîtes de Petri de telle manière que le couvercle emboîte le fond; stériliser dans cette position.

Pour l'usage : ensemencer en tubes de gélose-sérum comme d'ordinaire; verser le milieu, encore liquide, dans le couvercle de la boîte, préparée comme il vient d'être dit; laisser solidifier, couvrir le milieu avec le fond de la boîte. Le milieu de culture se trouve ainsi protégé entre deux parois de verre. Couvrir le tout d'une plaque de verre.

Le procédé est ingénieux; malheureusement, quand on enlève le fond pour faire des prélèvements, le milieu se trouve souvent disloqué.

B. — Isolement en tubes.

Tube de Vignal. — *Procédé recommandé.* — Préparer un tube de verre, d'environ 1 mètre de long sur 4 millimètres de large; effiler une extrémité, pratiquer un étranglement près de l'autre extrémité; boucher au coton l'extrémité large. Stériliser. On facilite les manipulations en coudant le tube en plusieurs segments (fig. 100).

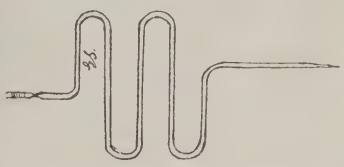

Fig. 100. — Tube de Vignal pour isolement des anaérobies.

Pour l'emploi :

a. Ajouter à un tube de gélatine quelques gouttes de solution de sulfo-indigotate de soude; le milieu devient légèrement bleu. Faire bouillir la gélatine pendant quinze à vingt minutes. Refroidir très rapidement (pour éviter l'absorption d'oxygène) sans amener la solidification du milieu. Arrêter le refroidissement quand la température est descendue vers 30°-35°.

b. Ensemencer le tube de gélatine. Mélanger.

c. Casser l'effilure du tube de Vignal; plonger la pointe dans la gélatine ensemencée; aspirer par l'autre extrémité; remplir jusqu'à l'étranglement. — On aura soin de plonger l'effilure en pleine gélatine, pour ne pas aspirer de bulles d'air.

d. Sceller d'abord l'effilure, puis l'étranglement.

Les anaérobies se développent en décolorant le milieu (bleui par addition d'indigo), parfois en dégageant des bulles gazeuses.

Pour faire un prélèvement : laver le tube, au niveau de la colonie

à prélever, à l'aide d'un antiseptique liquide quelconque ; rincer à l'eau stérile, sécher. Sectionner avec un couteau à verre flambé.

Tube en U de Roux. — Cet appareil se compose d'un tube horizontal, terminé aux deux extrémités par deux tubes plus étroits, coudés à angle droit et munis d'un tampon de coton (fig. 101).

Fig. 101. — Tube en U, de Roux.

Ensemencer un tube de gélatine. Verser la gélatine dans le tube en U, à l'aide d'un entonnoir à effilure fine, stérilisé. Relier l'une des branches à l'appareil producteur d'hydrogène ; faire passer le gaz pendant quelques minutes. Sceller successivement les deux effilures.

Porter le tube sous un courant d'eau froide, en le roulant entre les doigts pour enrouler la gélatine. Attendre la solidification.

Pour prélever : sectionner le tube.

Tube droit de Roux (fig. 102). — C'est un tube à essai, surmonté d'un tube plus petit muni d'un bouchon d'ouate. Remplir de gélatine et stériliser comme d'ordinaire.

Pour l'emploi : liquéfier la gélatine; ensemencer ; faire le vide et rincer à l'hydrogène ; sceller.

Tube de Fraenkel. — Tube à essai, fermé par un bouchon à deux tubulures coudées à angle droit, disposées comme l'indique la figure 98. Remplir de gélatine, stériliser.

Mode d'emploi — Liquéfier la gélatine, ensemencer ; relier le tube à l'appareil à hydrogène ; faire barboter le gaz pendant quelques minutes, sceller ; refroidir sous l'eau, en tournant pour enrouler la gélatine.

Fig. 102. — Tube droit de Roux (anaérobies).

Tube de Veillon. — *Procédé de choix.* — Préparer les tubes suivant les indications données plus haut (p. 182), en ajoutant 1 p. 1000 de nitrate de potasse.

Le développement en gélose sucrée s'accompagne communément de dégagement degaz, surtout d'hydrogène, insoluble ; ces gaz disloquent le milieu. En présence du nitrate de potasse, H donne de l'eau en réduisant le nitrate. L'acide carbonique, formé en même temps que H, est très soluble.

a. Faire bouillir au bain-marie une dizaine de tubes de gélose Veillon, pendant quinze minutes environ. Laisser refroidir à 40°-45 ; maintenir à cette température.

b. Charger la semence sur l'effilure d'une pipette, *scellée* ; on se sert de cette pipette comme d'un fil de platine. Ensemencer un premier tube en agitant la pipette dans la gélose fondue.

c. Sans recharger l'effilure, ensemencer de même un deuxième tube, et ainsi de suite jusqu'au dernier.

d. Refroidir rapidement les tubes ensemencés ; porter à l'étuve.

Les colonies se développent avec une rapidité variable. Il faut surveiller les tubes *tous les jours* et prélever sitôt qu'elles sont bien formées toutes les colonies qui, dans la zone anaérobie (à partir de 2 centimètres de la surface), présentent un aspect différent. Ne pas attendre pour les prélèvements ; car certaines espèces, très fragiles, meurent rapidement.

Pour opérer les prélèvements, plusieurs procédés.

1° On peut opérer comme pour le tube de Vignal (p. 185).

2° Ou bien, à l'aide d'une pipette à fine effilure, aller cueillir la colonie, sans toucher aux colonies voisines. On s'aide de mouvements de va-et-vient ; la gélose monte par capillarité.

Si la colonie est petite et profonde, il est bon de munir la pipette d'un tube de caoutchouc de 30 à 40 centimètres de long, aspirer avec la bouche (Guillemot).

3° L'un de nous emploie la technique suivante, par expulsion du bloc de gélose :

Introduire, en soufflant, l'effilure d'une longue pipette jusqu'au fond du tube, en longeant la paroi ; continuer à souffler en mobilisant un peu la pipette de haut en bas ; l'air insufflé au fond détache le bloc de gélose, qu'on amène ainsi jusque près de l'orifice du tube. Enlever alors la pipette ; chauffer le fond du tube : l'air chauffé se dilate et expulse le cylindre de gélose, qu'on recueille dans une boîte de Petri stérile. Cautériser la surface au point voulu et faire les prélèvements.

Remarque. — Les colonies développées dans la zone d'anaérobiose ne sont pas nécessairement des anaérobies vrais ; ce peuvent être — ce sont le plus souvent — des anaérobies facultatifs. Le réensemencement par piqûre sur gélose glucosée fait le diagnostic : les anaérobies facultatifs se développeront sur toute la hauteur de la piqûre ; les anaérobies vrais, exclusivement dans la zone d'anaérobiose.

Cette technique reste toujours un peu délicate, il faut s'y habituer. Le mode de prélèvement exige des colonies très séparées ; c'est pour cette raison qu'il faut faire des ensemencements nombreux, à dilutions peu espacées les unes des autres.

CHAPITRE XII

INOCULATION DES ANIMAUX

L'expérimentation sur les animaux est employée de manière courante dans les laboratoires. Ses indications sont multiples ; il suffira de rappeler les principales :

Reproduction expérimentale d'une maladie constatée chez l'homme ou chez l'animal ; détermination de la virulence des microbes ; production de lésions spéciales à certaines espèces : renforcement (exceptionnellement, atténuation) des virus ; préparation de sérums spécifiques (agglutinants par exemple) ; préparation de sérums thérapeutiques ; etc.

Nous étudierons successivement :

Les animaux de laboratoire ;

Les inoculations.

I. — ANIMAUX DE LABORATOIRE.

On désigne sous ce nom les animaux le plus habituellement employés dans les laboratoires. Ils doivent être autant que possible :

Réceptifs à l'égard de la plupart des virus ; faciles à manier ; faciles à élever, à entretenir et à observer ; peu onéreux.

Deux espèces surtout, le cobaye et le lapin, répondent à ces conditions. Viennent ensuite la souris blanche, plus fragile, et le rat blanc, un peu moins maniable. D'autres animaux sont parfois utilisés pour usages particuliers : la souris grise, le rat gris, le chat, peu commodes à manier ; le chien, les oiseaux (poule, pigeon), la grenouille, peu sensibles à la plupart des infections.

On peut avoir intérêt à s'adresser à d'autres animaux, chèvre, mouton, âne, cheval, singes. L'usage de ces espèces, vu leur prix élevé, est réservé aux Instituts ou aux grands Laboratoires.

Elevage et entretien. — Il est préférable d'élever les animaux d'usage courant au laboratoire même ; c'est moins cher, et on est

sûr de la provenance ; les chances de « maladies spontanées » (Voy. p. 191) sont réduites au minimum.

Cobaye. — L'élevage est facile. Chaque femelle peut donner trois à cinq portées par an ; pour chaque portée, un à cinq petits. Le mieux est de laisser les animaux par groupes pas trop nombreux (cinq à quinze), surveiller, séparer les femelles pleines. Durée de gestation, deux bons mois.

Parfois les femelles pleines saignent à blanc leurs nouveau-nés, quand la nourriture est trop sèche (prédominance du son) ; on s'en souviendra.

Comme nourriture : légumes ou débris de légumes (choux, salades, carottes, betteraves, suivant la saison), fourrage vert (trèfle, luzerne, herbe très jeune) ; son. Le meilleur régime est le mélange de son et de légumes. En l'absence temporaire de légumes ou herbages, mouiller le son. L'alimentation devra toujours être suffisamment aqueuse (légumes verts, son mouillé), mais il est inutile de donner à boire.

Lapin. — Élevage facile, mais les petits sont plus fragiles que les jeunes cobayes. La femelle peut donner trois à cinq portées par an, deux à dix petits par portée. Séparer les femelles une à une dès le début de la gestation (indispensable). La durée de gestation est environ trente-cinq jours.

Nourriture : comme le cobaye, mais se méfier des fourrages verts, surtout au printemps. On donnera de préférence du son et des légumes.

Souris blanche. — Élevage moins facile ; peu sociables, il faut souvent isoler les animaux un à un ; on séparera toujours les femelles pleines.

Nourriture : avoine, son, pain, débris de cuisine.

Toujours laisser une écuelle d'eau.

Rat blanc. — Élevage facile ; en moyenne six à dix petits par portée. Séparer les femelles pleines autant que possible.

Nourriture : comme la souris.

Grenouille. — Conserver dans un bocal large, avec une petite épaisseur d'eau au fond, couvrir de mousseline ; gaver (viande, etc.) tous les jours.

Autres animaux. — Pour les autres animaux, chien, chèvre, cheval, etc., on se conformera aux pratiques des éleveurs ou des physiologistes.

Les singes, trop délicats, ne conviennent qu'aux établissements importants. Les conserver en grandes cages (spéciales), en locaux chauffés, nourrir de fruits secs, pain, donner à boire.

Chenil, cages, bocaux. — Il faut au moins un chenil. Quand on pratique l'élevage, ce qui est utile et économique, il vaut mieux avoir deux chenils séparés, l'un pour les animaux en élevage, l'autre pour les animaux inoculés.

Le chenil sera tenu avec la plus grande propreté : lavages fréquents à grande eau ; la construction sera faite en conséquence.

Pour le chenil d'élevage de cobayes, lapins et rats blancs, des cages fixes en brique et ciment sont très commodes ; pour les cobayes, laisser devant les cages un espace libre qui leur permettra de courir librement quand le temps le permet. Assurer par des dispositions convenables l'écoulement des urines. Prévoir un nombre de cages suffisant pour permettre d'interchanger les locaux au moment des lavages. L'élevage peut être fait également en cages métalliques.

Les cobayes, lapins ou rats inoculés seront placés dans des cages métal-

liques (fig. 103), qu'on peut faire construire n'importe où. Ces cages seront autant que possible à double fond, faisant tiroir. Dans la cage, une auge et un râtelier. Extérieurement, une planche porte-étiquette. A moins d'indication contraire (élimination par l'intestin de germes dangereux), placer au fond un peu de paille.

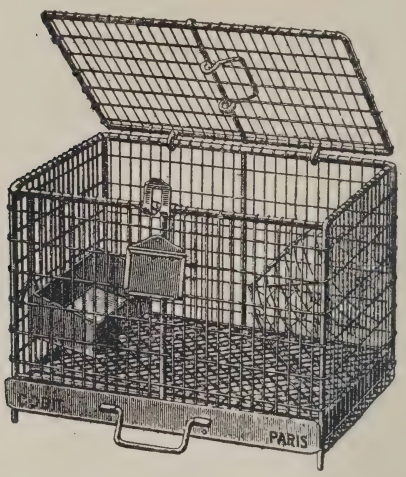

Fig. 103. — Cage pour animaux.

Pour les petits animaux, rats blancs et souris blanches, on peut utiliser des boîtes à biscuits percées de nombreux trous sur deux faces et sur le fond. Remplacer une des faces de la boîte par une vitre (face supérieure de préférence).

Les souris se trouvent bien de simples bocaux en verre de 2 à 4 litres, garnis largement de son et couverts d'un grillage métallique.

Tous ces animaux sont sensibles au froid ; les cobayes ne sont incommodés que par un froid rigoureux, Le chenil devra donc être chauffé l'hiver.

On désinfectera avec le plus grand soin (flambage, solutions antiseptiques) les cages ou bocaux qui viennent d'être habités par des animaux inoculés.

Tout animal mort, qu'il soit ou non inoculé, sera autopsié, en vue de connaître la cause de la mort : ce peut être l'amorce d'une épizootie, et il faut en être prévenu au plus tôt. Si les décès se répètent, procéder à l'isolement et à l'éloignement des « suspects », comme on le fait pour les épidémies ou les épizooties.

Certaines expériences particulièrement dangereuses exigent des précautions spéciales. Les animaux inoculés de peste, par exemple, seront abrités par une paroi susceptible d'arrêter les insectes. Les petits animaux peuvent être placés simplement dans un bocal couvert de grillage fin maintenu solidement, ou dans une caisse étanche (bidon à pétrole, boîte à biscuit) ouverte sur une seule face ; on complète la fermeture avec de la toile de moustiquaire ou de la gaze. Les inoculations du virus pesteux à de grands animaux ne doivent être faites que dans les Instituts spécialement organisés à cet effet.

Marques. — Il faut reconnaître les animaux inoculés. On peut les isoler se contenter de marquer les cages ou bocaux. Dans une même cage, on distinguera les animaux : en les marquant de couleurs d'aniline variées ou d'acide picrique (surveiller, les couleurs s'effaçant après quelque

temps); en passant des boucles d'oreilles numérotées (se détachent assez souvent); chez le cobaye, en notant les détails multiples de la robe : chez le lapin, en pratiquant aux ciseaux une ou deux incisions à l'extrémité de l'oreille, et notant en outre la robe. En tout cas, ne jamais oublier de marquer les animaux inoculés.

Maladies des animaux de laboratoire.

Ces maladies sont nombreuses ; il faut connaître les plus fréquentes, surtout pour éviter de les confondre avec des infections inoculées expérimentalement.

Cobayes. — Pseudo-tuberculose. — Assez fréquente, contagieuse. Les lésions simulent la tuberculose (tubercules). Nous la retrouverons plus loin (Voy. chap. *Pseudo-tuberculoses*).

Affections broncho-pulmonaires. — Fréquentes, aiguës, contagieuses, de nature variée. Entre autres agents pathogènes, on a décrit :

Un diplocoque non capsulé (Weber) ;

Un bacille court, mobile, poussant bien sur gélose, en couche crémeuse (Martini) ;

Un bacille court, ne prenant pas le Gram, cultivant facilement sur les divers milieux, ne coagulant pas le lait (Tartakowski).

Prophylaxie : sacrifier les animaux malades. Séparer les animaux sains, isolément autant que possible, sinon par petits groupes. Désinfecter vigoureusement les cages, mangeoires, etc.

Pasteurellose. — Décrite par Phisalix, elle se traduit avant tout par du jetage et de la dyspnée pendant la vie, par des lésions pulmonaires à l'autopsie. Dans le sang et les viscères, on trouve un bacille présentant les caractères des pasteurelloses (pasteurellose canine, chap. *Pasteurelloses*).

Prophylaxie : comme plus haut.

Trichomonas caviæ. — Ce parasite détermine parfois des épizooties très contagieuses et sévères (Galli-Valerio) ; entérite. A l'autopsie, parasites en abondance dans la paroi intestinale. Transmissible par ingestion.

Prophylaxie : comme plus haut.

Septicémie a pseudo-pneumocoques. — A la suite d'inoculations diverses, on constate parfois chez le cobaye la présence dans les organes d'un microbe très analogue au pneumocoque (Grenier).

Lapins. — Abcès. — Assez fréquents, particulièrement sous la peau, souvent très volumineux. Non ou peu contagieux. Inciser et traiter comme tout abcès chaud.

Gale. — Très fréquente, très contagieuse ; localisée aux oreilles,

sous forme de croûtes épaisses ; *acarus* visible par examen microscopique. La progression des lésions amène des convulsions, des accidents épileptiformes, et aboutit à la mort.

L'affection est curable au début. Décaper, toucher avec un tampon imprégné de polysulfure de potassium à 5 p. 1000.

Surveiller souvent le chenil à ce point de vue.

Prophylaxie : comme plus haut.

Pseudo-tuberculose. — Comme pour le cobaye.

Coccidiose. — Le *Coccidium oviforme* détermine la formation de kystes, blanchâtres ou blanc laiteux, ovoïdes, étagés le long des canaux biliaires, à la surface du foie, ou dispersés sur le péritoine viscéral. La ressemblance avec la tuberculose est grossière : kystes à contenu liquide, ou presque, superficiels, renfermant des parasites en quantité.

Septicémies. — Elles sont fréquentes et variées.

Signalons d'abord l'une des plus intéressantes, la *pasteurellose* (Thoinot et Masselin), évoluant tantôt comme une septicémie pure, tantôt comme une bronchopneumonie. L'agent pathogène est une *Pasteurella* non spéciale au lapin (Voy. chap. XLIII). Les pasteurelloses sont contagieuses, à marche aiguë ; pendant la vie, prostration et diarrhée. La mort est fatale.

L'agent décrit par Kraus, sous le nom de *bacille de l'influenza du lapin*, provoque une affection très contagieuse, très grave, avec fièvre, jetage et dyspnée : évolution subaiguë, mort. A l'autopsie, bronchopneumonie, pleurésie, rhinite. L'agent pathogène est un bacille mobile, ne prenant pas le Gram, poussant facilement sur milieux usuels, sans liquéfier la gélatine et sans coaguler le lait ; pathogène pour le lapin, le cobaye, la souris.

D'*autres septicémies* ont été signalées, provoquées par un microbe bien voisin du colibacille (Eberth et Mandry), par un microcoque ne prenant pas le Gram (Daremberg), etc.

Prophylaxie : comme plus haut.

Septicémie a pseudo-pneumocoques. — Comme chez le cobaye.

Rats. — Signalons, chez les *rats gris* (non chez les rats blancs) la présence fréquente de *trypanosomes* ; l'existence, plus rare, de la *lèpre des rats* (chap. *Bacille de la lèpre*) ; la possibilité d'une infection par le bacille de la *peste*.

Oiseaux. — Il existe tout d'abord des *septicémies contagieuses*, dues au colibacille : septicémie des poules, des pigeons. La *psittacose* (perroquet) reconnaît un agent spécial (Voy. chap. XXXII).

La *poule* est en outre sujette naturellement à nombre d'affections : *choléra des poules* (Voy. chap. XLIII), infection vibrionienne par le

Vibrio Metchnikovi (Gamaleia), etc. ; elle contracte fréquemment une *diphtérie*, contagieuse, provoquée par la bacille de la diphtérie humaine ou par tout autre microbe ; elle présente parfois de la *tuberculose* (tuberculose aviaire, chap. XLIX), ou de la *pseudo-tuberculose* (tuberculose zoogléique, chap. LI).

Dans le sang des diverses espèces d'oiseaux, on peut trouver des *hématozoaires* ou des *trypanosomes*.

Préhension, contention et anesthésie des animaux.

Préhension et contention. — Tous les animaux cherchent à se dérober quand on veut les prendre. Certains se défendent et sont difficiles à manier ; ils griffent ou mordent : chats, rats gris, parfois rats blancs. Il faut savoir les prendre, puis les maintenir.

Les animaux d'usage courant, lapin et cobaye, peuvent le plus souvent être maintenus sans appareils spéciaux. Mais certaines opérations, comme la ponction du cœur, la laparotomie, ou l'inoculation de virus dangereux, exigent une contention plus parfaite, instrumentale.

Les opérations sur les autres espèces sont faites de préférence ou nécessairement par contention instrumentale.

Il est bon de s'exercer à opérer seul, sans aide, toutes les fois que cela n'est pas impossible.

Lapin et cobaye. — Ils ne se défendent pas. Saisir par la peau du dos ou par une patte postérieure (cobaye), par la peau du dos ou par une oreille (lapin).

Fig. 104. — Contention entre les genoux.

Contention sans appareils. — *Pour inoculation aux pattes postérieures* : saisir l'animal par une patte postérieure ; le placer ventre en l'air, tête en bas, entre les genoux de l'opérateur, en laissant déborder les pattes postérieures ; serrer doucement, pour maintenir, sans écraser.

Pour inoculation intrapéritonéale : placer l'animal comme ci-dessus en laissant déborder l'abdomen et les pattes postérieures ; faire reposer la colonne vertébrale de l'animal sur la cuisse gauche de l'opérateur. Appuyer la face palmaire du

poignet gauche sur les pattes postérieures de l'animal, mouvement qui a en même temps pour effet de tendre l'abdomen (fig. 104).

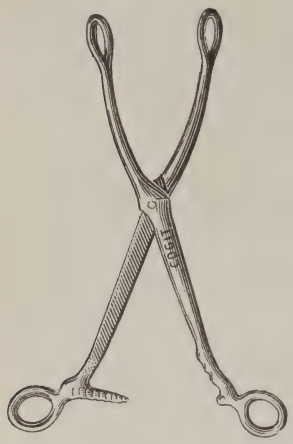

Fig. 105. — Pince à mors ajourés.

Contention par un aide. — Cela ne demande pas d'explications.

Contention instrumentale. — a. *Pour inoculations dangereuses au cobaye* (peste), il suffit de suspendre les animaux : utiliser la pince à mors ajourés (fig. 105), suspendre par l'œil d'une des branches.

b. *Pour interventions délicates sur lapins ou cobayes*, il faut maintenir les animaux à l'aide d'appareils spéciaux.

Appareils à contention. — Le plus simple est un *plateau en zinc*, à bords relevés, percés de trous pour fixer les attaches (fig. 107).

Veut-on fixer l'animal sur le dos : préparer quatre lacets en cuir, disposés en nœud coulant ; glisser un lacet autour de chaque patte, serrer; renverser brusquement l'animal, ventre en l'air, sur le plateau, passer rapidement un des lacets postérieurs dans un trou, l'autre lacet dans un

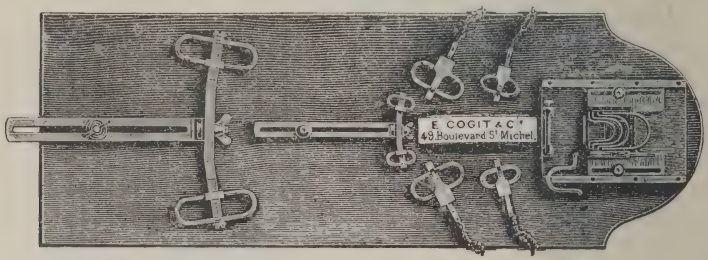

Fig. 106. — Appareil à contention de Latapie.

trou symétrique; les nouer l'un à l'autre ou les assujettir séparément; fixer ensuite les pattes antérieures.

La fixation sur le ventre est très simple.

S'il faut immobiliser la tête, on peut la faire tenir par un aide, ou bien la fixer avec le mors de Malassez (fig. 108), ou tout autre appareil analogue, qu'on fixe au rebord du plateau à l'aide d'un étrier à vis.

Quand on doit faire appel couramment à la contention instru-

mentale, il est beaucoup plus commode de s'adresser à des appareils spéciaux, dont les modèles sont nombreux. Nous citerons l'appareil de Latapie (fig. 106), très ingénieux, mais difficile à désinfecter (plateau en bois); l'appareil à plateau grillagé (fig. 107), commode

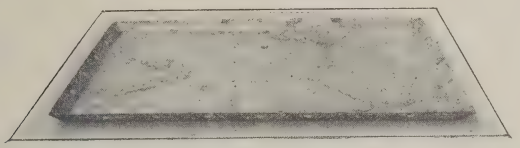

Fig. 107. — Plateau en zinc.

simple et facile à nettoyer; l'appareil de Debrandt, permettant l'immobilisation de tous les animaux de laboratoire.

Rat blanc. — Animal très doux, mais s'effarouche facilement, ne cherche pas à se défendre et peut être pris à la main. La race tachetée est souvent moins commode. S'il est indispensable, on

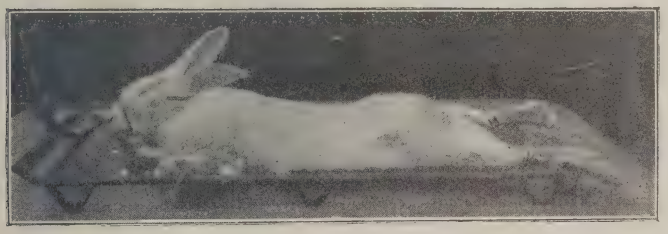

Fig. 108. — Plat au grillagé avec mors de Malassez.

se servira d'une pince pour prendre l'animal : pince à forcipressure, longue; saisir à la nuque.

Contention sans appareil. — Pour inoculer à la queue, on se contentera de placer l'animal sous une cloche, la queue débordant seule sous le bord de la cloche soulevée très légèrement.

Contention instrumentale. — a. *L'inoculation sous-cutanée* n'exige que de suspendre l'animal : saisir à la nuque avec une forte pince à forcipressure; passer l'œil d'une branche dans un crochet fixé au mur (fig. 109). Les deux mains sont libres.

b. *Pour opérations importantes*, on emploiera les appareils spéciaux.

Rat gris. — Animal très méchant; contention instrumentale avec ou sans anesthésie (Voy. *Rat blanc*).

Souris blanche. — Comme le rat blanc.

Chien. — Utiliser les dispositifs des laboratoires de physiologie, ou les appareils indiqués plus haut. Toujours museler l'animal.

Chat. — Toute opération délicate demande l'anesthésie.

Pour inoculations intrarectales, emprisonner dans un petit sac la partie antérieure du corps.

Anesthésie. — L'anesthésie est indispensable pour toutes les opérations délicates ou douloureuses. Les anesthésiques habituellement employés chez l'homme sont utilisables chez les animaux

Fig. 109. — Contention de la souris.

Lapin, cobaye. — On s'adressera de préférence au chloroforme; appliquer devant les narines une compresse (ou un cornet de papier-filtre) imbibée de chloroforme, attendre un instant, jusqu'à ce que l'apnée réflexe du début ait fait place à une respiration normale : l'anesthésie est à peu près immédiate; écarter la compresse. Au besoin, revenir plus tard à l'anesthésique. Ne pas donner les anesthésiques de la manière lente, plus dangereuse

Rat, souris, chat. — Ces animaux supportent le chloroforme suffisamment pour une anesthésie rapide, mais l'éther vaut mieux pour les opérations longues.

Placer les animaux sous cloche; jeter sous la cloche un tampon de coton imbibé d'éther. Enlever l'animal aussitôt qu'on le voit inerte; il faut surveiller pour éviter tout accident. Maintenir ensuite l'anesthésie à l'éther suivant les besoins.

II. — LES INOCULATIONS.

Matériel. — Le matériel comporte les instruments et accessoires d'usage courant en médecine ou en médecine vétérinaire; il nous paraît inutile d'y insister longuement.

L'asepsie est de rigueur. On stérilisera les instruments et les accessoires avant toute inoculation ; on désinfectera après.

A. Bistouris, ciseaux plats et courbes, pinces à dissection, pince à forcipressure, sondes cannelées, etc., seront stérilisés, par chauffage à sec à 160°, ou par un antiseptique. L'ébullition, le chauffage rapide au bec Bunsen, sont applicables aux seuls instruments non coupants ni tranchants. Après les opérations, laver et sécher soigneusement les instruments.

B. Outre les instruments chirurgicaux, il faut avoir sous la main :
De l'eau stérile, ou mieux de l'eau physiologique stérile ;
Du coton hydrophile stérile, en petits tampons ;
Du papier-filtre stérile, en petits fragments ;
Du fil et des aiguilles stériles.
Il est utile de préparer des provisions de ces divers accessoires.

Comme fil, utiliser la soie plate tressée (nos 2 ou 3) ; on peut faire bouillir au moment du besoin. Mieux vaut préparer des fils stériles, adaptés ou non à une aiguille à suture ; enrouler le fil sur un tube de verre ; placer dans un tube à essais ; stériliser à l'autoclave. Le modèle de la figure 110 est également commode ; on stérilise à l'autoclave le flacon renfermant la bobine de fil, disposée comme l'indique la figure. Avant chaque opération, rejeter le bout de fil qui déborde.

Fig. 110. — Bobine de fil stérile.

C. Les *seringues* seront les mêmes que celles employées d'habitude en clinique.

Pour les besoins de la bactériologie une seringue doit, outre les qualités requises par ailleurs (étanchéité, solidité, facilité d'emploi) :

1° Se prêter à des stérilisations répétées, même à l'autoclave ;

2° Être graduée exactement.

On pourra toujours, si l'on en possède, utiliser les modèles anciens de Pravaz (piston en acier, ne supportant pas la chaleur) ou de Strauss (piston en moelle de sureau, facile à remplacer).

Les seringues tout en métal sont robustes, mais ne permettent pas de suivre l'opération.

On s'adresse de préférence aux suivantes :

La *seringue de Debove* : cylindre en verre, armature métallique extérieure, piston formé de rondelles d'amiante. Grandeurs diverses ;

La *seringue de Roux* (pour sérothérapie) : cylindre de verre, piston en caoutchouc ou en durit (fig. 111). Capacité : 20 centimètres cubes ;

Les *seringues* entièrement *en cristal* (genre Lüer), piston et cylindre (fig. 112). C'est un modèle très pratique, guère plus fragile

que les précédents, avec lequel on suit facilement la marche des injections ; aucune partie ne craint la stérilisation. Grandeurs diverses. On prendra des seringues de 1 ou 2, 5 ou 10 et 20 centimètres cubes.

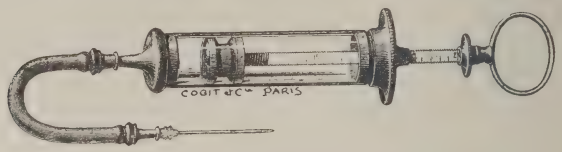

Fig. 111. — Seringue de Roux.

D. Les *aiguilles* sont ou en acier, ou en platine iridié. Les premières, plus rigides, sont préférables le plus souvent. Elles ont le gros inconvénient de rouiller facilement ; on les conservera dans l'alcool, ou dans une solution de borate de soude.

Fig. 112. — Seringue en cristal.

E. Il faut *stériliser* seringues et aiguilles. La simple ébullition suffit pour des inoculations courantes. S'assurer d'abord que l'aiguille s'adapte bien ; aspirer de l'eau avec la seringue pourvue de son aiguille ; il ne doit passer aucune bulle d'air. Placer dans l'eau froide, en interposant au fond du récipient un corps isolant, compresse, double fond perforé, etc., chauffer doucement, faire bouillir quelques minutes. Une fois l'inoculation faite, laver la seringue et faire bouillir à nouveau.

Pour prélèvements de produits à ensemencer, il est nécessaire de stériliser à l'autoclave, l'ébullition pouvant laisser vivantes des spores de saprophytes (*B. subtilis*, etc. ; Voy. la technique, p. 213).

F. On peut inoculer *à la pipette*, à défaut de seringue. Effiler l'extrémité et la couder ; perforer la peau au point choisi, avec la pointe d'un bistouri. Opérer ensuite comme avec la seringue, la bouche remplaçant le piston pour aspirer ou refouler.

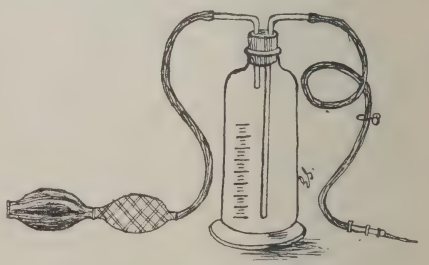

Fig. 113. — Appareil pour inoculations.

G. Lorsqu'on a besoin d'inoculer des quantités relativement considérables, il sera plus commode d'employer un appareil de grande

contenance, tel que celui de la figure 113; cette figure ne demande pas d'explications.

Préparation et dosage des virus à inoculer. — Préparation. — On inocule soit des cultures, soit des produits pathologiques.

A moins d'indication contraire, les produits virulents sont inoculés à l'état d'émulsion dans un liquide.

Cultures liquides. — Prélever une quantité largement suffisante de milieu, à l'aide d'une pipette; verser dans un vase stérile (verre, boîte de Petri); charger la seringue.

Produits pathologiques liquides (sang, pus, sérosités, urines). — Le sang et certaines sérosités (exsudat méningé, épanchement pleural) se coagulent. On peut inoculer de suite après prélèvement. On peut encore défibriner le sang au préable (Voy. *Analyse du sang*), ou bien le recueillir dans l'eau physiologique additionnée de 1,5 p.100 de citrate de soude; 2 parties de solution citratée pour 1 partie de sang.

Le pus sera injecté tel que ou dilué dans l'eau physiologique, suivant sa consistance.

Les sérosités et les urines ne renferment généralement qu'un petit nombre de microbes pathogènes; il faut alors centrifuger, recueillir le dépôt, le diluer dans un peu d'eau physiologique.

Cultures solides. — La plupart des cultures sur milieux solides peuvent être facilement émulsionnées dans un liquide (eau physiologique, bouillon) : verser le liquide dans un verre; prélever la quantité voulue de culture, la porter sur la paroi du verre, amener à son contact un peu de liquide, émulsionner et mélanger.

Certaines cultures très résistantes (tuberculose) seront traitées comme ci-dessous.

Produits pathologiques solides. — La plupart d'entre eux (produits inflammatoires, parenchymes d'organes) seront écrasés : les disposer au fond d'un verre; écraser avec un agitateur, à arêtes dures, flambé; verser peu à peu le liquide de dilution (eau physiologique). Attendre quelques minutes pour laisser décanter les particules les plus grosses, qui pourraient obstruer l'aiguille.

Procéder de même pour les cultures très solides.

Pour les tissus plus résistants (nodules fibreux ou fibro-crétacés) : couper en petits fragments, disposer au fond d'un verre avec du sable stérilisé ; écraser. Laisser reposer ou filtrer sur linge fin.

Quand on veut obtenir une division plus régulière, on s'adresse à des broyeurs spéciaux : broyeurs Chalyboeus (modèle courant des instituts vaccinogènes), broyeur Borrel, broyeur Latapie.

Les tissus solides peuvent être inoculés tels quels, sans manipu-

lation préalable, par insertion. Mais la dilution après broyage est presque toujours préférable.

Pour charger la seringue. — S'assurer que la seringue fonctionne bien (en aspirant de l'eau stérile) et ne prend pas d'air. Aspirer le liquide en quantité voulue.

S'il passe quelques bulles d'air, on peut s'en débarrasser comme suit : prendre un papier-filtre stérile (celui qui couvre le verre, par exemple); renverser la seringue chargée; avec l'aiguille, traverser le papier de bas en haut; expurger l'air. Si du liquide s'échappe, il retombe sur le papier. Brûler le papier.

En réalité, la présence de très peu d'air n'a d'importance que lors d'injection intraveineuse (embolie). D'ailleurs une bonne seringue bien chargée ne doit pas renfermer d'air.

Dosage. — Lorsqu'il s'agit de cultures ou de produits liquides, il faut toujours injecter une dose connue.

Pour cultures en milieux liquides, il suffit de s'en rapporter aux graduations de la seringue.

Pour les cultures en milieux solides, on dilue une quantité fixe de culture dans une quantité fixe de liquide : par exemple, une culture de vingt-quatre heures sur tube ordinaire de gélose, dans 15 centimètres cubes d'eau physiologique.

Ces procédés sont très approximatifs, mais suffisants dans la pratique.

Plus exact est le procédé suivant :

Faire une émulsion témoin, en versant quelques gouttes de nitrate d'argent en solution dans une solution de chlorure de sodium à 1 p. 10 000 (dans l'eau distillée). Prendre un tube vide de même diamètre que le témoin; y émulsionner la culture jusqu'à ce que la turbidité des deux tubes soit identique. Une épreuve (dilution sur plaques, p. 166) faite une fois pour toutes déterminera, pour chaque espèce considérée, le nombre des microbes contenus dans l'unité de volume de l'émulsion type.

On pourrait encore dénombrer les microbes par une technique imitée de celle de Wright-Harris-on (pour le vaccin antityphique) : mélanger la culture à une dilution de globules rouges, titrée au préalable; déterminer au microscope le nombre respectif des microbes et des globules; le nombre des globules étant connu, un calcul simple donnera le nombre des microbes.

S'il est utile de doser très rigoureusement, on s'adressera de préférence à la méthode des pesées. Il faut des balances extrêmement sensibles.

Technique des inoculations.

On peut inoculer dans les divers organes ou tissus.

Les inoculations peuvent être faites par *injection*, *insertion*, *inhalation* ou *ingestion*. Nous étudierons la technique de l'injection par

les diverses voies, en annexant, chemin faisant, ce qui concerne l'insertion, l'inhalation et l'ingestion.

Les indications essentielles des divers modes d'inoculation seront énumérées plus loin.

Préparation de la région. — Pour injections et inoculations à travers la peau, il faut d'abord mettre la peau à nu et désinfecter.

On se débarasse des poils, en les coupant et rasant. Chez le cobaye, l'épilation suffit. Chez les oiseaux, enlever les plumes.

On désinfectera — sauf indication contraire — à l'aide de la teinture d'iode, employée seule, peau à sec.

Inoculations superficielles. — Inoculation endermique. — Raser les poils; ne pas désinfecter. Laver à l'eau stérilisée.

Suivant les cas :

a. Ou bien déposer le virus sur la peau rasée;

b. Ou bien pratiquer des scarifications très superficielles. On ne doit pas voir le sang. Déposer le virus à la surface des scarifications, en frictionnant pour assurer l'inoculation.

Inoculation à la surface des muqueuses. — Suivant les cas : excorier, scarifier ou cautériser la surface ; y déposer le virus.

Inoculation dans les tissus cellulaire et musculaire. — Injection sous-cutanée. — Elle se pratique comme chez l'homme. Saisir la peau entre le pouce et l'index gauche, de manière à déterminer un pli ; enfoncer l'aiguille un peu au dessus de la racine du pli, s'assurer que la pointe est libre dans le tissu cellulaire (éviter de pénétrer dans les vaisseaux ou les muscles), injecter. Pour les virus dangereux, cautériser la plaie.

Choix du lieu d'injection. — Sauf indication contraire :

Chez le cobaye, face interne des cuisses (fig. 121, p. 216, IS), abdomen;

Chez le lapin, mêmes régions, ou sur le dos;

Chez le rat et la souris, base de la queue, pattes ou abdomen.

Insertion sous la peau. — Choisir une région à tissu cellulaire très lâche (pli de l'aine, par exemple). Pratiquer une boutonnière avec la pointe d'un scalpel; introduire une sonde cannelée, dilacérer le tissu cellulaire; dans le pertuis ainsi créé, et à l'aide de pinces fines ou d'un fil de platine fort, introduire profondément la pièce à inoculer; suturer la boutonnière.

Injection intramusculaire. — Chez le cobaye et le lapin, dans les muscles de la fesse ou de la partie externe de la cuisse; chez les oiseaux, dans les pectoraux. Technique analogue à l'inoculation sous-cutanée, plus profondément.

Inoculation dans les voies circulatoires. — Injection intraveineuse. — Elle se pratique le plus souvent sur le lapin. Elle

peut être faite également chez le cobaye et les gros animaux. On choisira toujours une veine superficielle (sauf indication contraire).

Lapin. — L'injection est facile dans la *veine marginale externe de l'oreille*, située à la partie externe de l'oreille, sur la face velue. On peut s'adresser aussi à la marginale interne, généralement plus petite; ou à la veine médiane, moins commode.

Les animaux dociles seront inoculés sans aide, posés sur les genoux de l'opérateur. Sinon, faire maintenir par un aide ou placer un appareil à contention.

a. La peau étant préparée, placer à la base de l'oreille une pince à pression douce (pince de blanchisseuse), comprimant la

Fig. 114 et 115. — Inoculation intraveineuse : à gauche, premier temps (oreille droite); à droite, deuxième temps. — A gauche, sur l'oreille gauche, voir la distribution des veines de l'oreille.

veine; celle-ci fait saillie. A l'aide de la main gauche, tendre l'oreille.

b. Introduire l'aiguille (biseau court) dans la veine, le plus possible parallèle à cette dernière, pointe dirigée vers la base de l'oreille; enfoncer de 1 centimètre environ.

c. Enlever la pince. Fixer l'aiguille en place, avec la pince. Pousser l'injection.

Si l'aiguille est bien dans la veine, le liquide passe sans effort, en distendant le vaisseau. Sinon, il se forme une boule d'œdème, et l'animal s'agite. Dans ce cas, enlever l'aiguille et recommencer plus bas.

d. Enlever l'aiguille, maintenir un instant la pince en place pour assurer l'écoulement du liquide, puis enlever la pince. Si la plaie saigne, maintenir à son niveau un tampon de coton aseptique; le comprimer avec la pince.

Cobaye. — On injectera de préférence dans la *veine jugulaire externe*. Dans sa partie accessible, elle se dirige presque parallèlement

à l'axe du cou, à 5 millimètres environ en dedans de l'angle du maxillaire inférieur (fig. 121, V). Elle chemine derrière les muscles peauciers, épais à ce niveau, et devant le sterno-mastoïdien qu'elle croise.

Pratiquer une incision longitudinale de 3 à 4 centimètres, suivant la direction indiquée (fig. 121, IV); traverser le peaucier. Dénuder à la sonde cannelée, chercher la veine, la soulever légèrement, injecter avec une aiguille très fine, pointe vers le thorax.

Chien. — Inoculer dans les *veines du jarret*, très visibles après compression de la cuisse, croisant le tendon d'Achille.

Fixer ou maintenir l'animal; comprimer la racine de la patte; inoculer, avec une forte aiguille en acier (résistance des téguments), à travers la peau. Au besoin, inciser la peau au bistouri. Pour le reste, comme ci-dessus.

Oiseaux. — Veine axillaire, à la racine de l'aile. Très visible après compression en aval.

Injection intra-artérielle. — Rarement indiquée, elle se pratique dans la fémorale ou dans la carotide. Se munir d'une aiguille très fine; cela permet de traverser la paroi artérielle sans risque d'hémorragie (élasticité des parois).

Pour injecter dans la *fémorale* : mettre à nu, largement, le pli de l'aine, par une incision longitudinale le coupant en son milieu. Repérer l'artère, reconnaissable à ses battements. Ouvrir l'aponévrose. Voir l'artère, piquer et injecter. Fermer la plaie, suturer.

Pour inoculation dans la *carotide*, suivre les indications données plus loin (p. 216).

Inoculation intra-oculaire. — On la pratique dans la *chambre antérieure de l'œil.*

Injection. — Fixer l'animal, immobiliser la tête. Maintenir l'œil largement ouvert, en écartant les paupières soit avec les doigts, soit avec un blépharostat. Piquer au niveau du limbe sclérotico-cornéen. Aspirer un peu d'humeur aqueuse; refouler le mélange de virus et d'humeur aqueuse. L'humeur aqueuse devient louche immédiatement.

Insertion. — Disposer l'animal comme ci-dessus; instiller quelques gouttes de cocaïne à 1 p. 50; attendre quelques minutes. Inciser la cornée près du limbe. Insérer la pièce avec une pince à iridectomie ou un stylet.

Inoculation dans les centres nerveux ou leurs enveloppes. — Injection sous-durale. — Elle est pratiquée le plus souvent chez le lapin (rage).

Fixer l'animal, ventre en bas; maintenir la tête appliquée contre

le plateau. Préparer la peau au point voulu. Inciser, jusqu'à l'os, sur la ligne médiane, sur une longueur de 3 centimètres, immédiatement en arrière de l'orbite. Écarter les lèvres de la plaie. Au milieu de l'incision, à quelques millimètres en dehors de la ligne médiane, dénuder l'os, appliquer le trépan (couronne de 5 millimètres); tourner avec précaution, jusqu'à ce que la résistance cesse. Enlever alors la rondelle osseuse. On aperçoit la dure-mère dans la profondeur. Injecter, avec une aiguille courbe, en pénétrant très obliquement (ne pas blesser le cerveau).

Chez le chien, on incise très en dehors de la ligne médiane pour éviter le sinus longitudinal supérieur.

Injection intracérébrale. — On peut opérer comme ci-dessus (inoculation sous-durale); mais le simple foret (ou un vieux scalpel) suffit. Une fois le crâne perforé, pousser l'aiguille droite, à la profondeur voulue.

Pour éviter toute erreur sur la profondeur, le mieux est d'utiliser des aiguilles présentant juste la longueur utile.

Injection intrapleurale. — Pour éviter de blesser le poumon, il est nécessaire de *voir* la plèvre.

Fixer l'animal. Préparer la peau au point voulu. A la partie antéro-interne du sixième espace intercostal droit, inciser sur quelques centimètres peau et tissu cellulaire; sectionner les muscles superficiels, dilacérer les muscles profonds; voir la plèvre dans la profondeur. Piquer avec une aiguille à biseau court, très obliquement-injecter.

Inoculation intrapéritonéale. — **Injection.** — Il faut éviter de blesser l'intestin.

a. Placer l'animal sur le dos de telle manière que la paroi abdominale soit fortement tendue. Préparer la peau. Faire pénétrer l'aiguille (biseau court) sous la peau, en la maintenant très oblique. Une fois l'aiguille dans le tissu cellulaire, la relever légèrement, perforer la paroi musculaire; on doit sentir, à la main ce moment opératoire. Injecter.

b. Ou bien : un aide tient l'animal ventre en l'air, non tendu; entre le pouce et l'index gauche, faire un pli comprenant toute l'épaisseur de la paroi. Avec l'aiguille, traverser la base du pli, de part en part. Retirer un peu l'aiguille, en mesurant le trajet pour laisser la pointe dans la cavité péritonéale. Injecter.

Insertion. — L'insertion intrapéritonéale nécessite une laparotomie; il faut opérer très proprement. On saura toutefois que le péritoine de la plupart des animaux de laboratoire (cobaye, chien) s'infecte beaucoup moins facilement que le péritoine humain.

a. Préparer la peau au point voulu. Entourer la région d'un champ opératoire. Une compresse bouillie, fendue au centre, suffit.

b. Pratiquer une incision longitudinale, à gauche de la ligne médiane, en dehors des muscles droits (fig. 121, IL) ; longueur, 4 à 6 centimètres; inciser couche par couche, en respectant d'abord le péritoine; fixer les lèvres musculaires de la plaie avec des pinces à forcipressure.

c. Faire une boutonnière au péritoine. Le soulever sur une sonde cannelée; ouvrir plus largement (incision juste suffisante).

d. Inciser profondément le produit à inoculer.

e. Suturer en deux plans : péritoine et muscles; peau et tissu cellulaire.

Inclusion en sacs de collodion. — Il faut préparer les sacs, puis les ensemencer, enfin les inclure dans le péritoine.

Préparation des sacs (fig. 116). — On utilisera du collodion ordinaire (sacs plus transparents) ou du collodion riciné (sacs plus élastiques), épaissis jusqu'à consistance sirupeuse. Pour le moulage des sacs, on emploiera des tubes à essai très propres, régulièrement calibrés, sans voussure ni aspérité extérieure. Se rappeler que les sacs se rétractent de telle sorte que leurs dimensions définitives sont d'environ un tiers inférieures à celles du moule.

Préparer en outre des ajutages : tubes de verre étirés en grosse effilure à une extrémité. Ces tubes seront un tiers moins larges que les moules.

a. Disposer le collodion dans un vase cylindrique (vase à précipiter). Éviter, en versant, la production de bulles d'air; sinon, attendre que ces dernières aient disparu.

b. Très doucement, plonger le tube dans le collodion, extrémité fermée en bas, jusqu'à la profondeur voulue (en général, 6 à 10 centimètres) ; veiller avec soin à n'introduire aucune bulle d'air. Laisser trente à soixante secondes.

Enlever doucement le tube; le sortir complètement. L'excès de collodion s'écoule.

Répéter les mêmes opérations au moins deux ou trois fois, parfois plus, suivant l'épaisseur qu'on désire, en évitant les bulles d'air.

c. Retirer le tube définitivement. Le rouler doucement entre les doigts. Laisser égoutter complètement.

Retourner le tube, orifice en bas; maintenir ainsi jusqu'à ce que le collodion paraisse sec, ce qui demande quelques minutes. Surveiller constamment.

Il faut laisser sécher juste à point; enlevée trop tôt, la couche de collodion se déchire; laissée trop longtemps, elle s'écaille.

Au temps *c*, la couche de collodion ne doit toucher aucun objet. Le tube-support peut être placé, orifice en bas, dans un petit verre à pied.

d. Enlever le sac en dégainant : à l'aide des ongles, détacher en repoussant vers le bas l'extrémité supérieure du collodion ; la main droite coiffée d'un linge uni (sarrau) saisit le sac à pleine main sur toute sa hauteur ; la main gauche soutient le haut du tube. Tourner les deux mains en sens contraire, la main droite tirant en outre vers le fond : le sac se détache.

Fig. 116. — Sacs de collodion ; fermeture au verre.

Insuffler le sac. S'assurer qu'il est étanche.

En le soulevant légèrement (tige métallique, baguette de verre), l'exposer à la vapeur d'eau bouillante, puis jeter dans l'eau bouillante. Le sac prend alors son volume définitif.

Dans l'orifice, introduire l'ajutage (partie large). Assurer la fermeture à l'aide de quelques tours de fil de soie bien serrés.

Remplir d'eau ; s'assurer que la fermeture est étanche : pour cela, plonger le sac entièrement dans l'eau ; souffler par l'effilure ; il ne doit passer aucune bulle d'air. A l'aide d'un fil, suspendre le sac dans un vase contenant de l'eau ; couvrir le vase, stériliser.

Ensemencement des sacs. — Pour utiliser les sacs :

a. A l'aide du fil : retirer le sac du récipient protecteur ; le placer dans un verre stérile.

Avec une pipette stérile, le vider de l'eau qu'il contient.

b. Remplacer l'eau par le milieu de culture voulu, ensemencé.

c. Saisir l'ajutage avec une pince ; sceller l'effilure.

Variantes. — 1° A l'ajutage, on peut substituer le support de Phisalix (fig. 117), tube perforé ; sert de soutien, évite la rupture des sacs.

2° L'ajutage peut consister en un tube non effilé ; on bouche alors l'orifice libre à l'aide de petits bouchons de caoutchouc, stérilisés. Les assujettir en couvrant de collodion.

3° Le procédé suivant (fig. 118) est aussi avantageux que le procédé type.

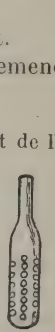

Fig. 117. — Tuteur de Physalix.

Préparer les sacs comme ci-dessus (*a* à *d*) ; stériliser pleins d'eau.

Pour l'utilisation : enlever les sacs avec une pince stérile, essuyer extérieurement au papier-filtre stérilisé ; vider. Avec plusieurs doubles de papier-filtre stérilisé, confectionner une petite

corbeille, y poser le sac; soutenir la corbeille, sans comprimer, entre le pouce et l'index gauche. Assécher l'orifice du sac, à l'aide d'une pince à dissection chauffée très légèrement : placer une branche de la pince dans le sac, l'autre branche en dehors; rapprocher les deux branches. Répéter l'opération jusqu'à ce que l'orifice soit sec. Remplir à moitié de liquide ensemencé.

Fig. 118. — Sac de collodion; fermeture à la cire.

Fermer à la cire Golaz : fondre avec une tige métallique (manche en bois) ou un agitateur surchauffés; enduire de cire fondue toute la bordure interne de l'orifice; accoler l'un à l'autre les deux bords de l'orifice en serrant extérieurement entre les mors d'une pince jusqu'à ce que la cire fasse prise par refroidissement. Consolider la fermeture, en obturant de même à la cire le bord externe de l'orifice. Comprimer un peu le fond, pour s'assurer que la fermeture est bien étanche. Les sacs ainsi préparés ne se rompent presque jamais dans le péritoine, même après plusieurs semaines; ils ne provoquent jamais la mort de l'animal par étranglement intestinal.

Inclusion. — Inclure dans le péritoine par laparotomie.

Traitement ultérieur. — Le sac est laissé en place un temps variable, deux ou trois jours à plusieurs semaines suivant les indications.

Pour l'enlever : sacrifier l'animal. Le sac est libre pendant les premiers jours, mais à la longue il s'entoure d'une gangue conjonctivo-vasculaire, dont il faut le débarrasser avec précaution.

Le sac enlevé, cautériser le fond, ou casser l'effilure après flambage; aspirer le contenu à l'aide d'une pipette stérile.

Sacs de roseaux. — On s'adresse à la membrane qui tapisse la cavité du roseau. On coupe des fragments de roseau de la longueur voulue ; on fait bouillir quinze minutes si le roseau est frais, sinon on porte le même temps à l'autoclave. Tailler un des bouts de manière à mettre à nu la membrane sur une longueur suffisante pour placer ensuite une ligature sur la partie libérée ; la ligature faite, repousser la membrane dans le roseau, à l'aide d'une baguette de verre, et faire sortir par l'autre bout. Adapter à l'extrémité libre de la membrane un tube de verre comme pour le sac de collodion, lier sur le tube ; placer sur le sac près du verre une ligature lâche (ligature d'attente) ; remplir d'eau, stériliser comme ci-dessus.

Pour utiliser le sac : vider ; introduire le liquide ensemencé ; serrer la ligature d'attente. Détacher du tube de verre, enduire de gomme laque les deux ligatures. Inclusion et traitement ultérieur : comme pour les sacs de collodion.

Inoculations dans les voies respiratoires. — Injection intratrachéale. — *Chez les mammifères* : fixer l'animal sur le dos; placer un billot sous la nuque pour tendre le cou. Préparer la peau

Au long du cou, pratiquer une incision médiane d'environ 3 centimètres, peau et tissu cellulaire ; ouvrir l'aponévrose sur une sonde cannelée ; injecter entre deux anneaux, pointe en bas. Suturer.

Pour les petits animaux, il est souvent utile de passer un fil à travers la trachée pour l'immobiliser.

Chez les oiseaux : ouvrir largement le bec, attirer la langue en dehors ; la trachée apparaît sous la langue, béante ; y injecter directement.

Inhalation. — On fait inhaler à l'animal soit une émulsion pulvérisée par un appareil approprié (appareil de Richardson, par exemple), soit, quand ils supportent la dessiccation, des virus desséchés avec une poudre inerte, charbon animal, poudre de lycopode, etc. ; la poudre est injectée à l'aide d'un soufflet.

Le dispositif adopté doit écarter tout danger pour l'opérateur. On se contente généralement d'une boîte métallique pleine, percée de trois trous : deux (avec tampon de coton filtrant) pour la respiration de l'animal, le troisième pour introduire le tube terminal du pulvérisateur ou du soufflet.

Inoculations dans les voies digestives. — Ingestion. — 1° Il suffit le plus souvent de *mélanger la culture aux aliments* : son, légumes, lait, pâtée, suivant les animaux. Il est bon de laisser les animaux à jeun pendant douze à vingt-quatre heures auparavant.

Ou bien, on inclut le virus dans l'intérieur de fragments de pomme de terre (Koch), de capsules de gélatine, etc.

2° On peut également *entonner*, procédé surtout expéditif chez les animaux de petite taille. Prendre un tube de verre à paroi épaisse ; y pratiquer une effilure courte, roder l'orifice de l'effilure, boucher au coton l'autre orifice ; stériliser, laisser refroidir.

Aspirer la culture ; boucher avec un doigt l'extrémité libre du tube ; de la main gauche, soutenir la tête de l'animal, nez franchement en l'air ; insinuer l'effilure de la pipette entre les dents ; laisser couler goutte à goutte, lentement. Patience.

Avec un peu d'habitude, cette technique est expéditive et sûre ; elle permet, en outre, un dosage assez rigoureux.

On peut procéder de même chez le veau (entonner à la bouteille) ; chez les oiseaux : inclure le virus dans des boulettes de farine ; les déposer à la base de la langue.

3° Le *cathétérisme de l'œsophage* permet de porter les aliments dans l'estomac. Écarter les mâchoires avec un bâillon : rectangle de liège percé d'un trou au centre, ou simple cadre de fil de fer solide ; faire écarter par un aide. La sonde (sonde urétrale) sera alors

introduite facilement par l'œsophage jusque dans l'estomac; manœuvrer doucement pour ne pas érailler la muqueuse. Adapter alors l'embout de la seringue à l'orifice libre de la sonde; injecter.

Remarque. — Il est souvent utile d'alcaliniser au préalable l'estomac et aussi de restreindre les mouvements péristaltiques (évacuateurs) de l'intestin. Pour le premier objet : introduire dans l'estomac quelques centimètres cubes de bicarbonate de soude à 5 p. 100. Pour le deuxième : injecter dans le péritoine de la teinture d'opium, 0cc,30 p. 100 grammes du poids de l'animal.

Injection dans le tube digestif. — Pratiquer une laparotomie au point voulu. Laisser sortir ou attirer, avec les doigts, une anse intestinale. Avec une aiguille fine, d'un coup sec, piquer à travers la paroi, injecter; retirer l'aiguille. Fermer la paroi comme d'ordinaire. L'intestin, très rétractile, aveugle immédiatement la petite plaie.

Pour trouver le *duodénum*, qui est fixe, inciser sur la ligne médiane; repérer l'estomac, suivre l'une des courbures vers la droite. Le duodénum fait suite.

Injection dans le rectum. — Injecter directement avec une sonde à extrémité mousse.

On peut aussi badigeonner le rectum avec un tampon, imbibé de virus, porté sur une baguette de verre ou sur tout autre conducteur.

Inoculation dans la vésicule biliaire (cobaye). — Pratiquer une laparotomie avec incision en L (fig. 121, 1B) : branche verticale 4 à 6 centimètres, à partir des fausses côtes; branche horizontale, à droite, 3 à 4 centimètres, partant de l'extrémité inférieure de la branche verticale. Chercher la vésicule sous le bord inférieur du foie (fig. 121, B et F). Piquer, injecter.

Inoculation dans les voies biliaires. — Chez le lapin et le cobaye : même incision que la précédente; reconnaître l'estomac, puis le duodénum. A droite et en arrière du duodénum, on voit émerger le pédicule porto-biliaire; reconnaître le cholédoque, blanc, mou. Injecter avec une aiguille très fine.

On trouverait dans le même pédicule la *veine porte*.

Observation des animaux inoculés.

Tout animal inoculé sera suivi chaque jour. On notera les phénomènes pathologiques perceptibles. Signalons les plus importants.

Lésion locale. — Au point d'inoculation : date d'apparition, étendue, forme, couleur. Réaction ganglionnaire.

Poids. — Peser l'animal avant l'inoculation; peser à nouveau au cours de la maladie, à intervalles réguliers.

Température. — Prendre la température rectale, deux fois par

jour, à l'aide de thermomètres spéciaux : petit réservoir, équilibration très rapide. Établir une courbe thermique.

Il faut connaître la température normale des animaux en expérience :

Lapin	39°,5 à 40°
Cobaye	37°,8 à 38°,8
Oiseaux	41°,5 à 42°,5.

Troubles digestifs. — Inappétence, diarrhée, etc.

Troubles nerveux. — Paralysies, convulsions.

État général. — Amaigrissement. Habitus extérieur : excitation ou abattement, prostration. Hérissement des poils.

L'observation sera complétée ultérieurement :

1° Par l'étude des lésions locales après incision ;

2° Eventuellement, par des examens bactériologiques (lésions locales, sang) pratiqués pendant la vie ;

3° Par les constatations d'autopsies ;

4° Par la recherche des microbes et des altérations histologiques sur les tissus ou pièces d'autopsie.

Choix de l'espèce animale à inoculer et du mode d'inoculation.

Quand le virus est indéterminé, il faut l'inoculer aux espèces animales communes par les voies les plus habituelles.

Si, au contraire, le virus est connu, ou si la recherche a pour but de constater la présence ou l'absence d'un microbe déterminé, il faut choisir l'espèce animale à inoculer, de même que le mode d'inoculation.

Le choix de l'espèce animale est lié à la réceptivité des animaux.

Réceptivité des animaux. — Les animaux ne sont pas uniformément réceptifs à l'égard de toutes les bactéries pathogènes. On trouvera à cet égard les notions indispensables à propos de chaque espèce microbienne ; nous signalerons simplement la grande réceptivité des trois espèces animales les plus habituellement employées à l'égard de certains des agents pathogènes les plus communs :

Cobaye. — Charbon bactéridien, Bacilles de la peste, de la morve (cobaye mâle), de la fièvre typhoïde, Bacilles paratyphiques, Bacilles de la diphtérie, du tétanos, Bacille tuberculeux humain, Vibrion septique, *Bac. Bellonensis*, *Bac. Perfringens*, Vibrion cholérique, Spirochétose ictéro-hémorragique.

Lapin. — Staphylocoque, Streptocoque, Pneumocoque, Bacille

de la peste, de la fièvre typhoïde, Bacilles tuberculeux bovin et aviaire, Vibrion cholérique.

Souris blanche. - Pneumocoque, Tétragène, Charbon bactéridien, Bacilles de la peste, de la fièvre typhoïde, du tétanos.

Choix du mode d'inoculation. — Il n'est pas indifférent d'inoculer par telle ou telle voie, les effets produits pouvant être très différents. L'exemple classique à cet égard est constitué par les réactions du lapin à l'égard du Streptocoque (Voy. chap. XVIII), réactions très variables suivant la voie de pénétration du virus.

Nous nous bornerons à résumer les indications essentielles des principaux modes d'inoculation.

L'*inoculation endermique* convient au virus vaccinal (veau, lapin), de même qu'aux inoculations de microbes très infectants contenus dans un milieu très impur : bacille pesteux chez le cobaye, pneumocoque chez la souris.

Les indications des *inoculations sous-cutanées* sont très nombreuses et concernent la presque unanimité des microbes virulents ; signalons entre autres la recherche de bacilles infectants dans les produits impurs : tuberculose et morve chez le cobaye, pneumocoque chez le lapin et la souris ; la production de lésions spéciales par suite d'une évolution lente, comme la tuberculose du cobaye; l'inoculation des anaérobies, l'étude de l'action des toxines ou anticorps, etc.

L'*inoculation intraveineuse* détermine généralement des lésions plus graves ou plus hâtives que l'inoculation sous-cutanée ; citons la réalisation de la tuberculose septicémique par injection de bacille tuberculeux aviaire (lapin), la staphylococcie expérimentale (lapin). Ce mode d'inoculation est employé pour l'étude expérimentale des septicémies ; il est en outre utilisé pour provoquer l'apparition d'anticorps à la suite d'injection de microbes, de toxines, etc.

Plus sévère encore est habituellement l'*injection intrapéritonéale* (péritonite cholérique, typhique, colibacillaire, etc.).

La méthode des *sacs de collodion* convient à la fois à la mise en évidence de certaines toxines (Voy. *Choléra*) et à la culture de certaines espèces particulièrement délicates.

On s'adressera à l'*ingestion* pour reproduire le choléra intestinal (jeune lapin), les empoisonnements alimentaires (souris, cobaye) ; l'*inhalation* permettra de provoquer la tuberculose chez le cobaye.

Les *injections intracraniennes*, généralement très graves, sont surtout employées pour l'étude de la rage, du tétanos (tétanos cérébral).

CHAPITRE XIII

PRÉLÈVEMENT DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

Les prélèvements de produits pathologiques peuvent être opérés chez l'homme ou chez l'animal.

Nous étudierons sucessivement : les prélèvements sur le vivant; les autopsies ; les prélèvements cadavériques.

Règle générale. — *Dans tous les cas, les produits destinés aux cultures ou aux inoculations seront recueillis aseptiquement.*

I. — PRÉLÈVEMENTS SUR LE VIVANT.

I. — Chez l'homme.

Sang. — 1° **Piqûre de la peau.** — Pour examen direct (recherche des parasites) ou pour récolter 1 à 2 centimètres cubes en vue d'un sérodiagnostic, la piqûre de la peau suffit.

On choisira de préférence le lobule de l'oreille, moins sensible que la pulpe du doigt.

Laver la peau à l'alcool-éther ; laisser sécher.

a. Pour examen direct, piquer profondément, franchement, avec une épingle ou un vaccino-style flambés ; recueillir le sang sur lame, goutte par goutte ; étaler ou couvrir d'une lamelle (chap. *Analyses bactériol. appliquées à la clinique*).

b. Pour récolte du sérum, même opération ; recueillir le sang dans un petit tube. Masser la région pour faciliter l'écoulement.

Nettoyer la plaie à l'alcool-éther.

2° **Emploi de la ventouse scarifiée.** — Peu recommandable ; le sang n'est pas stérile, et le procédé est douloureux.

Stériliser des ventouses capuchonnées de papier-filtre.

Désinfecter la peau à l'alcool-éther ; laisser sécher, rincer à l'eau stérile. Placer les ventouses et scarifier (bistouri stérilisé) suivant les procédés habituels.

3° **Ponction de veine.** — Quand on veut *cultiver* le sang, il est *indispensable* de le prélever dans une veine superficielle. C'est également le procédé de choix quand on veut en recueillir plusieurs centimètres cubes.

Stériliser à l'autoclave une seringue avec son aiguille. Le mieux est de les placer dans un cylindre de verre (fig. 119), un vase à précipiter, etc.; mettre au fond du coton hydrophile largement imbibé d'eau; boucher à l'ouate et couvrir de papier.

La stérilisation par ébullition est très aléatoire.

Employer de préférence des aiguilles en acier, de 3 à 5 centimètres, à biseau bien acéré et de large calibre.

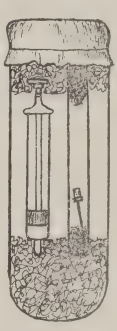

Fig. 119. — Stérilisation des seringues et aiguilles.

a. Mettre à nu le membre supérieur; le faire reposer, allongé, bien soutenu sur le lit. Placer vers le tiers supérieur du bras une bande modérément serrée. Les veines font saillie.

b. Désinfecter la région du pli du coude à la teinture d'iode.

c. Sur une veine bien turgescente, sans se préoccuper de ses rapports anatomiques, repérer le point de ponction; éviter de traverser les follicules pilo-sébacés, bien visibles (nids à microbes difficiles à désinfecter) et assez espacés. Pousser l'aiguille, d'un coup sec, la pointe dirigée vers la racine du membre, presque parallèlement à la veine; la peau traversée, pénétrer dans la veine. Aspirer doucement; le sang doit venir immédiatement.

d. La seringue remplie, enlever rapidement seringue et aiguille; séparer l'aiguille, verser le sang dans un récipient stérilisé; rincer la seringue à l'eau.

Le récipient varie suivant le but cherché. Veut-on simplement récolter le sérum, verser dans un grand tube ou une fiole d'Erlenmeyer stériles. Veut-on pratiquer une hémoculture, on suivra les indications données plus loin (Voy. chap. *Analyses bactériol. appliquées à la clinique*).

e. Placer sur la plaie un pansement sec. Jamais de collodion.

Sérum. — Le sang ayant été recueilli comme il vient d'être dit, laisser reposer au frais; après quelques heures, le sérum est nettement séparé; après quarante-huit heures, la séparation est complète. Décanter le sérum, le recueillir en récipient stérile. S'il est trop rouge, centrifuger.

Quand on est pressé, recueillir le sang, avant coagulation, dans un tube à centrifugation; centrifuger immédiatement. Le sérum se sépare au cours de la centrifugation.

Sérosités (exsudats pleuraux, péritonéaux, méningés, articulaires, etc.). — Les sérosités seront prélevées suivant les procédés courants en clinique; on observera les précautions d'asepsie indiquées à propos du sang.

Si les germes sont peu nombreux, il est nécessaire de centrifuger

Centrifugation. — Répartir le liquide dans des tubes à centrifugation, stérilisés et bouchés. Centrifuger. Les microbes et les éléments cellulaires se déposent au fond, en formant un culot.

a. Pour ensemencer le culot : se munir d'une pipette stérile, à longue effilure, flamber, plonger dans le liquide jusqu'au fond, laisser monter le culot (par capillarité) ; au besoin, aspirer doucement. Retirer la pipette, ensemencer.

On prélèverait de même pour les inoculations.

b. Pour examens directs du culot : on peut opérer comme en *a*. Quand la sérosité est albumineuse (plèvre, péritoine), il vaut mieux décanter le liquide, en ne laissant que le culot; diluer ce dernier dans un peu d'eau physiologique ; étaler sur lames.

Il existe un grand nombre de modèles de centrifugeurs, à main, à eau, électriques (V. p. 232).

Pus. — Sitôt l'abcès ouvert (par le chirurgien), prélever dans la profondeur, à l'aide d'une pipette à effilure large et forte. Éviter le sang autant que possible.

Si l'abcès ne doit pas être ouvert : désinfecter la peau ; ponctionner avec une seringue armée d'une aiguille de gros calibre.

Exsudats des muqueuses. — Exsudats des muqueuses superficielles (conjonctive, vulve, etc.). — Ils seront prélevés à la pipette, à la pince ou au fil de platine, suivant leur consistance.

Exsudats pharyngés. — S'il existe des fausses membranes, les détacher à l'aide d'une pince, ou, si elles sont trop friables, les enrouler sur un écouvillon droit; sécher la fausse membrane avec du papier-filtre stérile avant d'ensemencer.

Le mucus pharyngé sera prélevé, après rinçage de la gorge par gargarisme à l'eau stérile, avec un écouvillon droit (fig. 120).

Fig. 120. — Écouvillons coudé et droit.

Exsudats rhino-pharyngés. — La bouche étant largement ouverte, introduire l'extrémité d'un écouvillon coudé (fig. 120) dans le rhino-pharynx, en contournant la face postérieure de la luette; imprimer à l'écouvillon de légers mouvements de rotation.

Urines. — Recueillir par cathétérisme aseptique. Sinon, faire uriner le malade dans trois verres stériles, conserver le dernier pour examen.

Selles. — Le plus souvent, il suffit de recueillir les selles dans un vase flambé.

Si les microbes, rares dans les selles, sont plus abondants dans l'intestin grêle (porteurs de bacilles typhiques et paratyphiques), il est préférable de vider d'abord le gros intestin par deux lavages à l'eau bouillie; donner ensuite un troisième lavage, recueillir en plusieurs vases flambés; conserver seulement le dernier pour examen.

Expectoration. — Procédé habituel. — Recueillir les crachats : pour examens directs, dans un vase propre; pour inoculations, dans un vase stérile.

Récolte pour cultures. — Il faut se débarrasser des saprophytes très nombreux provenant du pharynx et de la bouche. On suivra avec profit la technique suivante, i itée de Kitasato : recueillir un crachat dans un récipient renferma ıt du sérum artificiel stérile; à l'aide d'une pince ou de papier-filtre, porter dans un deuxième verre d'eau physiologique stérile, agiter; laver de même une troisième fois. Prélever une parcelle au centre.

Pièces chirurgicales. — Les pièces destinées aux examens bactériologiques seront recueillies aseptiquement, suivant les procédés chirurgicaux; on évitera l'emploi des antiseptiques; on évitera également de toucher avec les doigts, même désinfectés. La pièce, manipulée avec des instruments stériles, sera reçue dans un vase stérile; on fera ensuite, et *le plus tôt possible après l'extirpation*, les prélèvements et ensemencements, suivant les règles ordinaires.

II. — Chez les animaux de laboratoire.

Sang. — Ponction du cœur. — Ce procédé, d'usage courant en physiologie, est entré depuis quelques années dans la pratique habituelle des laboratoires. Bien conduit, il est inoffensif. Il suffit à tous les besoins. On doit s'y habituer.

Opérer avec des instruments stérilisés : seringue de 20 centimètres cubes, armée d'une aiguille de Roux (lapin); seringue de 2 à 10 centimètres cubes et aiguille de Pravaz (cobaye et rat blanc). On s'assurera que le biseau de l'aiguille est très acéré.

Le cœur du lapin et du cobaye déborde généralement très peu le sternum à gauche (fig. 121, C et PC); il est assez souvent médian

Pour repérer le point de pénétration, il suffit de percevoir au doigt les battements cardiaques; on ponctionnera vers la pointe, au ras du sternum. — Voici d'autres repères plus précis : chez le lapin, à 3 millimètres du bord gauche du sternum, dans le troisième espace intercostal. On détermine facilement cet espace en repérant de bas en haut; c'est le quatrième espace rencontré en remontant à partir de l'angle chondro-xiphoïdien (Nicolle et Ducloux). Chez le

cobaye, à 1 centimètre environ au-dessus de l'angle chondro-xiphoïdien, à gauche, près du sternum (Raybaud et Hawthoorn). Chez le rat blanc, même repère que pour le cobaye.

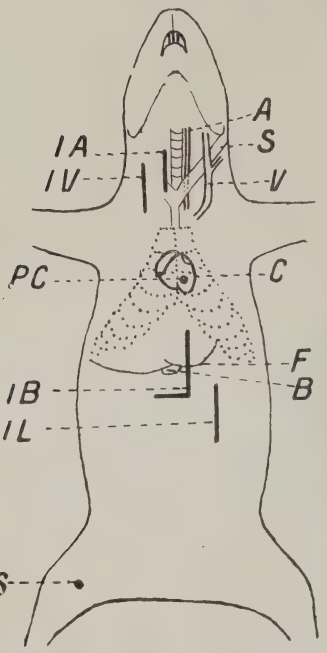

Fig. 121. — Principaux repères opératoires chez le cobaye.

A, carotide; S, muscle sterno-mastoïdien; V, veine jugulaire externe; C, cœur; F, bord inférieur du foie; B, vésicule biliaire. — IA, incision pour ponction de la carotide; IV, pour injection dans la jugulaire; IB, pour découverte des voies biliaires; IL, pour laparotomie; PC, point d'élection pour ponction du cœur; IS, inoculation sous-cutanée.

Au point choisi, raser et aseptiser la peau; enfoncer d'abord l'aiguille à travers les plans superficiels, en ayant soin d'éviter les côtes. Diriger ensuite la pointe légèrement à droite, enfoncer d'un coup sec.

Aspirer très doucement, sans déplacer l'aiguille. Prélever la quantité voulue; on peut prélever sans crainte 20 centimètres cubes chez le lapin, 4 à 6 centimètres cubes chez le cobaye. Retirer ensuite l'aiguille d'un coup brusque.

Séparer l'aiguille; répartir le sang soit en tubes vides stériles (pour récolte du sérum), soit dans les milieux de culture (pour préparation des milieux sanglants).

Ponction de la veine. — Lapin (fig. 122). — On s'adresse d'ordinaire à la veine marginale de l'oreille. Préparer une pipette coudée, effilée à son extrémité; casser l'effilure avec une pince flambée; au besoin régulariser les bords, les maintenir bien coupants.

a. Comme *a* (p. 202).

b. Tournant l'effilure de la pipette vers l'extrémité de l'oreille, traverser la peau, pénétrer ensuite dans la veine, très obliquement; enfoncer de quelques millimètres. Le sang monte dans la pipette. Si l'écoulement s'arrête trop tôt, imprimer à la pipette de très légers mouvements.

c. Quand on a prélevé la quantité voulue, enlever la pipette d'un coup sec; sceller l'extrémité.

d. Enlever la pince; placer un tampon antiseptique sur la plaie; le maintenir quelques minutes avec la pince

Ponction de l'artère. — Lapin et Cobaye. — On s'adresse en général à la *carotide*, qui ne donne pas de branches collatérales;

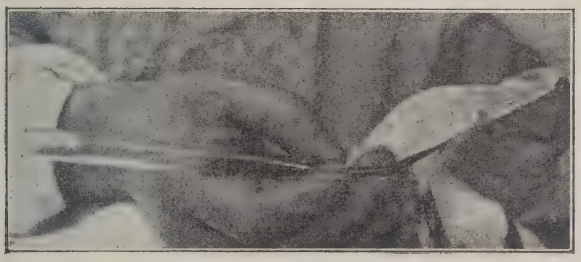

Fig. 122. — Prélèvement de sang dans la veine de l'oreille du lapin.

elle est située derrière la trachée dans une gaine commune avec le pneumogastrique et la jugulaire interne. Le sterno-mastoïdien croise devant (fig. 121, A et IA).

Raser et aseptiser la peau. Pratiquer une incision longitudinale de quelques centimètres, près de la ligne médiane, au bord de la trachée; inciser l'aponévrose; récliner en dehors le muscle sterno-mastoïdien, récliner également le muscle sterno-thyroïdien appliqué sur la trachée. En dehors et en arrière de la trachée, sentir les battements de l'artère, la dénuder à la sonde cannelée sur 3 ou 4 centimètres. Placer une ligature serrée à sa partie supérieure; glisser un autre fil sous la partie inférieure; faire un nœud de ligature, sans serrer (ligature d'attente); en soulevant et comprimant le bout inférieur de l'artère entre les doigts, introduire l'effilure d'une pipette coudée (fig. 123). Cesser la compression. Le sang monte rapidement. Quand on a prélevé la quantité voulue : serrer la ligature inférieure; enlever la pipette, sceller.

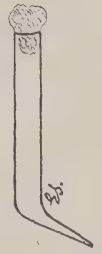

Fig. 123. — Pipette pour ponction artérielle.

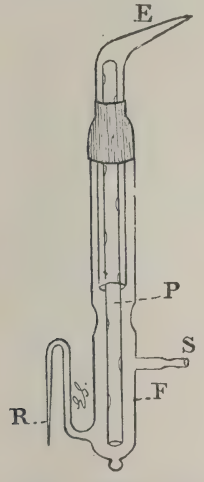

Fig. 124. — Appareil Latapie pour récolte du sang des petits animaux.

Sérum. — Opérer comme chez l'homme (p. 213).

Pour augmenter la quantité de sérum obtenue, on peut employer des appareils spéciaux. Signalons l'*appareil Latapie* (fig. 124) : on coude et effile l'extrémité borgne E d'un tube à essai ; l'autre extrémité est introduite dans un autre tube un peu plus large, portant dans sa partie libre deux tubulures latérales ; dans l'axe, un petit tube de verre percé de trous, P ; une bague de caoutchouc fixe le tube à essai sur le grand tube. Le tout est stérilisé à l'autoclave. — Pour recueillir le sang : disposer l'appareil E en bas, casser E ; prélever dans l'artère ou dans la veine, comme ci-dessus. — Pour récolter le sérum : renverser l'appareil ; le sérum tombe en F, alors que le caillot est retenu par P. Il ne reste plus qu'à faire compression par S pour recueillir le sérum en R.

Fig. 125. — Appareil Lumière pour récolte du sérum.

Au même but sert l'appareil Lumière (fig. 125). On recueille le sang par le bout coudé. Pour récolter le sérum, renverser l'appareil ; le sérum s'écoule, pendant que le caillot est retenu par les pointes de verre.

Urines. — Fixer l'animal sur le dos ; laver la région du méat. Asperger le ventre d'eau froide, ce qui provoque la miction. Recueillir l'urine en plusieurs verres ; garder seulement le dernier.

Le prélèvement du *pus*, des *sérosités*, etc., sera pratiqué en suivant les mêmes règles que chez l'homme.

II. — AUTOPSIES.

Remarques générales. — *a.* Les organes et tissus se laissent envahir après la mort par les microbes préexistants, spécialement le Colibacille et le *Proteus* (Würtz et Hermann). Cette *infection cadavérique* est d'autant plus hâtive que la température extérieure est plus élevée et que l'intestin est altéré. Le foie, puis le sang sont en général les premiers infectés.

b. Par suite, dans les autopsies humaines, faites vingt-quatre heures après la mort, on se souviendra de ces infections cadavériques. La présence des germes signalés peut être un fait normal, sans relation avec la maladie cause du décès.

c. Chez l'animal, l'autopsie sera toujours faite sitôt après la mort. On a même souvent intérêt à le sacrifier (par anesthésie prolongée, par piqûre du bulbe, etc.) et à pratiquer l'autopsie aussitôt.

A. — Chez l'homme.

On pratiquera l'autopsie suivant la technique habituelle en anatomie pathologique ; nous n'avons pas à y insister.

Les prélèvements pour examens bactériologiques porteront spécialement : dans tous les cas, sur le sang du cœur, les parenchymes du foie, de la rate, des reins ;

Éventuellement, suivant les circonstances, sur toute lésion localisée, sur les divers parenchymes, la moelle osseuse, les cavités naturelles (voies biliaires, vessie), les centres nerveux.

B. — Chez l'animal.

Prescriptions absolues. — *Tout animal mort dans un laboratoire, qu'il soit ou non inoculé, sera autopsié* (p. 190).

Les cadavres d'animaux morts de maladies infectieuses seront, après autopsie, toujours détruits ; il ne faut ni les abandonner ni les enfouir. On les détruira par combustion dans un four crématoire ou dans un foyer à fort tirage; sinon, on peut les entailler largement, arroser de pétrole et brûler; à défaut, noyer dans une terrine pleine d'acide sulfurique.

Préparatifs de l'autopsie. — Nous nous occuperons exclusivement des petits animaux (cobaye, lapin, souris, poule, pigeon, etc.).

a. Fixer solidement l'animal sur un plateau à autopsie (fig. 107).

Les cobayes, lapins, rats seront assujettis par les quatre pattes, à l'aide de forts liens passés dans les trous percés au bord du plateau.

Souris : opérer comme pour le cobaye; ou bien placer sur une plaque de liège et transfixer les pattes avec des épingles.

b. L'animal est placé ventre en l'air pour l'autopsie générale; ventre en bas pour l'autopsie des centres nerveux.

c. Avant de commencer l'autopsie, arroser avec une solution antiseptique; couper les poils ou arracher les plumes sur la ligne d'incision.

d. Les instruments (bistouris, ciseaux, pinces) seront stérilisés ou flambés *avant et après* l'autopsie.

Autopsie générale. — *a.* Procéder d'abord à l'examen extérieur; constater les lésions ; opérer les prélèvements utiles. Insister, le cas échéant, sur le point d'inoculation.

b. Pratiquer l'incision des téguments sur la ligne médiane, du cou au pubis ; prolonger l'incision jusqu'à la racine des membres. Libérer largement les téguments, les rabattre sur les côtés.

c. Si l'on soupçonne un épanchement du péritoine ou de la plèvre, prélever d'abord dans ces cavités avant de les ouvrir.

d. Ouvrir l'abdomen : en soulevant la paroi avec des pinces, pratiquer sur la ligne médiane une simple boutonnière, pour constater l'état du péritoine. S'il y a lieu, opérer un prélèvement. Terminer ensuite l'ouverture du péritoine : inciser sur toute la ligne médiane ; détacher les incisions musculaires costales, en respectant le diaphragme.

e. Examiner successivement : la cavité abdominale, le péritoine,

le foie avec les voies biliaires, la rate, les reins, les capsules surrénales, les ganglions mésentériques. Pratiquer des coupes sur chaque organe. Noter les lésions et opérer tous prélèvements utiles.

f. Examiner le tube digestif ; placer une ligature au-dessus du cardia, une autre sur le rectum; détacher en entier, ouvrir aux ciseaux mousses. Voir le contenu et les parois.

g. Passer aux organes du bassin : aspirer l'urine de la vessie, ouvrir la cavité ; examiner et ouvrir les organes génitaux.

h. Ouvrir le thorax : inciser le diaphragme ; couper de bas en haut les côtes, très en dehors, y compris la première ; rabattre en haut et détacher le plastron osseux.

i. Voir d'abord le péricarde ; opérer un prélèvement s'il est indiqué; ouvrir largement aux ciseaux. Soulever la pointe du cœur avec une pince; prélever le contenu.

j. Examiner les plèvres, puis le poumon : étude et prélèvement comme pour les autres viscères.

k. Éventuellement, compléter l'autopsie par l'examen des os, des articulations, etc. — Pour la moelle osseuse : casser le sternum, cautériser la surface de section, prélever dans la profondeur. Ou bien libérer le fémur, couper (ou scier), cautériser, prélever.

Autopsie des centres nerveux. — *a.* Incision médiane, allant du nez à l'extrémité de la colonne vertébrale. Dénuder le crâne ; détacher les masses musculaires des gouttières vertébrales ; ruginer doucement les os.

b. A l'aide du davier appliqué à la racine du nez, tenir solidement la tête ; avec une cisaille, sectionner les arcades orbitaires; reprendre le davier, tordre les arcades orbitaires; sectionner le frontal à sa partie antérieure. Compléter à la cisaille l'ouverture de la boîte cranienne, On arrive alors à la moelle : saisir au davier les apophyses épineuses; avec la cisaille, couper les lames vertébrales une à une. Il faut opérer prudemment, pour ne pas blesser la moelle.

c, Les centres nerveux étant mis à nu, opérer les prélèvements ou enlever en entier, suivant les indications.

III. — PRÉLÈVEMENTS CADAVÉRIQUES.

Les règles sont les mêmes pour les prélèvements chez l'homme ou sur l'animal.

Prélèvements pour investigations complètes (pour examen direct, cultures et inoculations). — Il faut opérer avec l'asepsie la plus rigoureuse.

A. **Prélèvement de produits liquides (sang, sérosités, liquides d'excrétion, pus, etc.).** — *a.* Fixer l'organe ou la région à l'aide de pinces.

b. Cautériser fortement la surface.

c. Faire pénétrer à travers l'escarre, l'effilure, flambée, d'une pipette. Aspirer, en imprimant à la pipette de légers mouvements de va-et-vient ; éviter de transpercer l'organe ou la cavité.

d. Ensemencer immédiatement par les méthodes d'isolement. Réserver une partie du liquide pour examen direct et inoculation. Au besoin, centrifuger au préalable.

B. **Prélèvement dans les parenchymes (foie, rate, etc.).** — Opérer exactement comme en A. Pour ensemencer et inoculer, dissocier dans un peu de liquide stérile (bouillon, sérum artificiel).

Prélèvements pour simple examen direct. — L'asepsie n'est pas utile. Pour les liquides : prélever à la pipette, porter sur lame ; couvrir d'une lamelle ou étaler. Pour les parenchymes : prélever un fragment, porter sur lame ; étaler en écrasant le tissu.

Prélèvements pour examens sur coupes. — Tailler les pièces avec des bistouris ou ciseaux bien tranchants (Voy. p. 249 le traitement ultérieur).

CHAPITRE XIV

MICROSCOPE ET ULTRA-MICROSCOPE

I. — MICROSCOPE.

Un bon microscope (fig. 126) est le premier instrument nécessaire au bactériologiste.

Constitution. — Il faut connaître succinctement sa constitution. Il comprend : un statif, une partie optique.

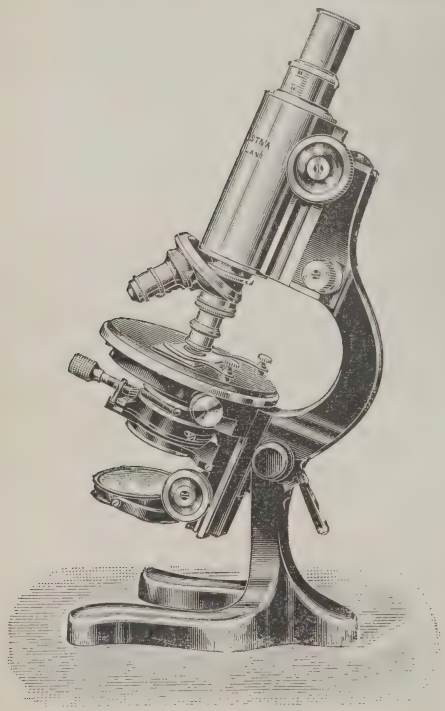

Fig. 126. — Microscope.

Statif. — Le statif se compose essentiellement d'un *pied*, surmonté d'une *colonne*. La colonne porte, en avant : à sa partie inférieure, un *miroir*, mobile dans tous les sens ; au-dessus du miroir, un *diaphragme*, puis un *condensateur Abbé*, tous deux mobiles verticalement et latéralement ; au-dessus du condensateur, une *platine* ; à sa partie supérieure, une branche horizontale, terminée par un *pignon* muni d'une *vis à crémaillère*. Le pignon reçoit le *tube* qui porte la partie optique. Il existe en outre une *vis micrométrique*, à ressort.

Le *pied* sera large et lourd, pour assurer la stabilité.

Il est très utile que la *colonne* soit articulée au pied, pour permettre de donner au tube une inclinaison variable.

Le *miroir* est plan d'un côté, concave de l'autre.

La *platine*, percée au centre d'une large ouverture pour le passage des rayons lumineux réfléchis par le miroir, sert de support aux préparations. Il est bon qu'elle soit *mobile*, de manière à permettre de faire passer facilement sous l'objectif les divers points des préparations.

On peut modifier l'action utile du faisceau lumineux : par le *condensateur*, qui condense les rayons vers la préparation; pa le *diaphragme*, dont l'ouverture varie à volonté. On emploie en général le diaphragme iris.

Le *tube* est formé de deux cylindres emboîtés l'un dans l'autre. Il portera à sa partie inférieure un *revolver porte-objectifs*, pour trois objectifs (ou quatre); on y vissera et laissera à demeure les objectifs d'usage courant. Chaque douille du revolver doit porter un numéro indiquant quel objectif il faut y visser : on respectera cette indication, sinon l'appareil pourrait être décentré.

A son orifice supérieur, le tube reçoit les *oculaires*.

Les *mouvements du tube* sont opérés avec la *vis à crémaillère* (grands déplacements) ou la *vis micrométrique* (déplacements très limités).

Partie optique. — Elle comporte des oculaires et des objectifs.

Oculaires. — On emploie partout l'oculaire de Huyghens : deux lentilles plan-convexes, l'une supérieure (frontale), l'autre inférieure (verre de champ), séparées par un diaphragme.

Les oculaires sont numérotés, par ordre de grossissement croissant : I, II, III. On peut se contenter des nos I et III.

Il existe en outre des oculaires dits *compensateurs*, souvent préférables pour les forts grossissements. Ils sont construits pour *compenser* les imperfections de l'achromatisme des objectifs.

Objectifs. — C'est la partie essentielle du microscope. Il y a lieu de distinguer deux sortes d'objectifs : 1° les objectifs à sec; 2° les objectifs à immersion homogène.

Les *objectifs à sec* conviennent pour des grossissements modérés. Ils sont désignés, chez la plupart des constructeurs (Stiassnie, Nachet, etc.), par les chiffres 0, 1, 2, etc., jusqu'à 9, ordre de grossissement croissant. Numéros correspondants de Zeiss : a^1 à a^3, B à E.

Pour des grossissements plus forts, il vaut mieux employer les *objectifs à immersion homogène*. — En passant successivement du verre (de la préparation) dans l'air, puis dans le verre des objectifs, les rayons lumineux se réfractent, parce que les indices de réfraction de ces divers milieux sont inégaux, d'où perte de netteté et de clarté. On évite cet inconvénient avec les objectifs dits à immersion homogène, en interposant entre la préparation et l'objectif un liquide dont l'indice de réfraction est sensiblement le même que celui du verre de l'objectif. Le liquide employé est aujourd'hui l'*huile de cèdre* (autrefois : l'eau); il est préférable de la demander au fournisseur de l'objectif, l'huile préparée par chaque fabricant étant adaptée à ses objectifs.

Les objectifs à sec ou à immersion actuellement employés sont dits *achromatiques*, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de manière à éviter autant que possible la dispersion des couleurs fondamentales du spectre ; la correction, sans être parfaite, est suffisante. Elle est plus complète avec les objectifs dits *apochromatiques*, mais leur prix est très élevé.

On doit demander à tout objectif de laisser voir nettement le contour des objets (*pouvoir définissant*), de même que les objets au-dessus ou au-dessous du foyer (*pouvoir pénétrant*) et des détails délicats (*pouvoir résolvant*). Pour apprécier ces diverses qualités, on peut examiner avec ces objectifs soit des test-objets spéciaux : *Pleurosigma angulatum, Amphipleura pellucida*, etc., livrés par les fournisseurs d'instruments ; soit, plus simplement, des préparations de microbes colorés sur coupes (Bacille tuberculeux, organes morveux, etc.).

Mode d'emploi du microscope.

Le bactériologiste utilise le microscope pour examiner : soit des microbes colorés sur lames (cultures ou frottis), soit des microbes non colorés, soit des coupes colorées.

Sauf indication contraire, on examine les premiers avec les objectifs à immersion; les seconds avec les objectifs à sec (parfois à l'ultra-microscope; voy. plus loin); les dernières, successivement, à sec et avec immersion. — On peut encore examiner, à sec, les colonies microbiennes sur milieux solides.

Dans tous les cas, il faut s'assurer d'un éclairage convenable.

Éclairage. — La lumière diffuse du jour constitue le meilleur éclairage. Si elle ne suffit pas, il faut recourir aux lumières artificielles. La meilleure et la moins fatigante est le bec Auer ; vient ensuite la lampe à albocarbone, puis la lampe électrique. Une simple lampe à pétrole, avec lentille condensatrice, peut suffire. Il est utile d'intercaler entre l'œil et la source éclairante un écran, qui laissera éclairé le miroir seulement.

Remarques. — *Avec l'objectif à sec* : *miroir concave* ; *pas de condensateur*.

Avec l'objectif à immersion : *miroir plan* ; *condensateur*.

On se rendra compte de la distance qui sépare chaque objectif de la préparation, quand l'objectif est au point. Cette distance — *distance frontale* — est d'autant moindre que l'objectif est plus puissant.

Examen avec l'objectif à immersion. — Mettre en place l'oculaire et l'objectif. Tirer le tube (p. 226, *b*), lui donner l'inclinaison la plus favorable pour l'observation. Disposer le miroir, face plane en haut; mettre en place le condensateur.

a. Fixer la préparation sur la platine; y déposer, en face l'objectif, une goutte d'huile de cèdre.

Avec la vis à crémaillère, abaisser l'objectif jusqu'à environ 2 millimètres de la préparation.

Placer l'œil sur l'oculaire. Assurer un éclairage convenable (en donnant au miroir l'orientation la plus favorable).

b. Mise au point. — Très doucement, abaisser l'objectif jusqu'à ce que l'objet apparaisse, plus ou moins net, peu importe.

c. A ce moment, saisir la vis micrométrique, la mouvoir doucement, jusqu'à ce que l'image soit très nette : la mise au point est faite, l'examen commence.

d. Dans la suite de l'examen, les deux mains seront constamment occupées : l'une demeure sur la vis micrométrique, de manière à fouiller en profondeur les plans successifs de l'objet examiné ; l'autre, portée sur les boutons moteurs de la platine, déplace la préparation en temps opportun.

e. L'examen terminé, relever l'objectif (vis à crémaillère) ; enlever la préparation ; nettoyer l'objectif.

Pour nettoyer l'objectif : capuchonner le doigt d'une toile fine, essuyer la lentille ; enlever le reste de l'huile de cèdre avec le même linge (ou une peau de chamois) imbibé d'une petite goutte de xylol.

Examen avec l'objectif à sec. — Employé seul, ce mode d'examen est utilisé surtout pour l'étude des microbes vivants. On prendra un objectif fort, 7 à 9 ; oculaire I ou III.

Examinés sans coloration, les microbes sont moins visibles qu'après coloration ; ils sont facilement noyés par la lumière, en tout cas ils tranchent peu sur le fond incolore. On fera bien de s'habituer en examinant des microbes mélangés à des corps facilement visibles, globules rouges, par exemple.

Placer le miroir face concave en haut ; pas de condensateur.

a. Mettre en place la préparation. — Abaisser l'objectif et éclairer comme ci-dessus ; diaphragmer si la lumière est trop intense.

C'est seulement par expérience qu'on apprendra à connaître quel degré d'éclairement est le plus favorable.

La distance indiquée, 2 millimètres, convient pour l'objectif 8 ou 9. Pour des grossissements moindres (parasites, etc.), on laisserait une distance plus grande, approximativement égale à la distance focale.

b, c, d. Comme ci-dessus.

Grossissement. — Mensurations.

Pour examiner utilement des microbes, il faut des grossissements de 500 à 1 200 diamètres. Quelques germes, comme le microbe de la

péripneumonie des bodivés (Nocard et Roux), demandent 2000 diamètres.

Grossissement. — Le grossissement du microscope *dépend du grossissement des deux systèmes optiques, oculaire et objectif, et de la distance qui sépare les deux systèmes.*

a. On ne peut demander à l'oculaire qu'un grossissement modéré, car les oculaires trop puissants diminuent la clarté et la netteté.

b. Il en est de même de la distance entre l'objectif et l'oculaire, distance représentée par la longueur du tube : une longueur trop grande enlève clarté et netteté.

La distance optima est 160 millimètres. On l'obtient en tirant le cylindre supérieur (et interne) du tube jusqu'à la marque 160.

c. C'est à l'objectif qu'il appartient d'assurer la majeure partie du grossissement.

La valeur du grossissement, pour chaque objectif, avec toute la série des oculaires, l'écartement des deux systèmes étant de 160 millimètres, est indiquée par tous les fabricants pour leurs instruments respectifs. Les indications données par les marques connues n'ont pas besoin d'être vérifiées.

Voici, à titre d'exemple, la table des grossissements pour les appareils Stiassnie :

TABLE DES GROSSISSEMENTS.

Numéros des objectifs.	Oculaires.	
	I.	III.
2 (à sec).	34	66
7 —	345	621
9 —	690	1 242
1/12 (à immersion).	625	1 125
1/17 —	960	1 728

Mensuration des microbes. — Les dimensions des microbes, étant très réduites, sont exprimées en millièmes de millimètre, ou en μ (prononcer : *mu*). La mensuration exige l'emploi d'un oculaire micrométrique et d'un micromètre objectif.

L'*oculaire micrométrique* se compose d'un oculaire ordinaire, entre les deux lentilles duquel est intercalé un disque de verre portant une échelle graduée en *dixièmes de millimètre.*

Le *micromètre objectif* est constitué par une lame de verre portant une série rectiligne de traits espacés de *un centième de millimètre.*

a. Mettre l'oculaire micrométrique à la place des oculaires. Disposer le micromètre objectif sur la platine. Examiner, amener les deux échelles graduées au parallélisme, en tournant l'oculaire; superposer les deux zéros, en déplaçant le micromètre objectif. Parcourir les deux échelles et noter les deux premiers traits qui se confondent.

Supposons que le trait 20 de l'oculaire corresponde au trait 5 de l'objectif; 20 divisions oculaires représentent, sur l'objectif-préparation, 50 μ (5 fois 1/100 de millimètre); 1 division oculaire $= \frac{50\,\mu}{20} = 2\,\mu, 5$.

b. L'objectif micrométrique est enlevé et remplacé par la préparation portant l'objet à mesurer. On constate que l'objet couvre N divisions de l'oculaire.

La longueur L de l'objet est $N \times 2\,\mu, 5$.
Si $N = 3$, en nous reportant à l'exemple précédent, nous aurons :

$$L = 2\,\mu, 5 \times 3 = 7\,\mu, 5.$$

Remarque. — *a*. En pratique, si les mensurations sont exceptionnelles, l'opération peut être faite en sens inverse : déterminer d'abord à combien de divisions oculaires correspond l'objet examiné; chercher ensuite, comme en *a* ci dessus, la valeur d'une division oculaire.

b. Il est commode de déterminer une fois pour toutes la valeur d'une division oculaire pour chacun des objectifs forts. Un examen et une notation avec l'oculaire micrométrique, suivis d'une multiplication par les chiffres voulus, donnent rapidement les dimensions cherchées.

Entretien du microscope. — Le microscope est un instrument délicat, qui demande à être entretenu avec le plus grand soin.

A. Dans l'intervalle des examens, il sera mis à l'abri des poussières et des vapeurs du laboratoire et des rayons solaires. Dans ce but, on le replacera dans sa boîte; sinon, il sera couvert d'une large compresse (protégeant objectifs et oculaires) et placé sous une cloche de verre.

B. Les objectifs constituent la partie la plus délicate, d'autant plus que leur puissance est plus grande.

a. Lorsque le champ du microscope est impur, présentant des grains de poussière, on déterminera d'abord si les poussières adhèrent à l'oculaire ou bien à l'objectif; on fait tourner l'oculaire sur lui-même : si les images se déplacent en même temps, elles proviennent de l'oculaire; sinon, c'est l'objectif qui est sale. Dans ce dernier cas, on nettoiera la lentille extérieure de l'objectif avec un linge fin, comme il a été dit plus haut: si c'est insuffisant, on nettoiera avec un linge imbibé légèrement de xylol ou d'alcool, puis de xylol. Avoir soin d'employer peu de xylol; un excès pourrait dissoudre le ciment qui assujettit les lentilles.

b. Si ce nettoyage extérieur ne suffit pas, on adressera les objectifs au fabricant. Ne jamais démonter soi-même les objectifs puissants (objectif 6

à sec, et au delà; objectif à immersion). On opérera de même si l'objectif est trouble.

On peut au contraire démonter sans danger les objectifs faibles.

c. Avoir soin de ne jamais laisser tremper les objectifs dans le liquide des préparations, surtout si ce liquide est caustique ou albumineux. Si l'accident se produit, nettoyer de suite, comme plus haut.

C. L'oculaire sera essuyé de temps à autre. S'il renferme des poussières (Voy. B, *a*), nettoyer soigneusement les faces extérieures des deux lentilles; si les poussières persistent, dévisser les lentilles, nettoyer les faces intérieures, remettre en place.

Le condensateur, le miroir, la platine seront nettoyés suivant les besoins, par les mêmes procédés.

On lubrifiera de temps à autre les organes de glissement (vis, tube à tirage) avec un peu d'huile de vaseline.

II. — ULTRA-MICROSCOPE.

On connaît le phénomène de Tyndall : lorsque, dans une pièce close, filtre un rayon de soleil, les poussières en suspension dans l'air deviennent visibles, alors qu'elles sont habituellement invisibles; elles deviennent visibles, parce qu'elles réfléchissent la lumière, tandis que tout le reste demeure obscur.

Tout le principe de l'ultra-microscopie est là : dans l'examen ultra-microscopique, on éclaire l'objet, et on n'éclaire que lui ; tout ce qui est autour de l'objet, devant ou derrière lui, doit être obscur. C'est ce qu'on appelle habituellement « l'éclairage sur fond noir ».

On pratique l'examen ultra-microscopique avec les microscopes, objectifs et oculaires habituels, en leur adjoignant des dispositifs particuliers, qu'on peut appeler « appareils à fond noir ».

Ces appareils sont assez anciens, puisque les naturalistes les emploient depuis 1853. Mais, faute d'un éclairage suffisant, ils ne se prêtaient pas aux examens ultra-microscopiques ; c'est seulement dans ces dernières années que l'emploi de lampes très puissantes a permis leur utilisation en bactériologie, après les travaux de Siedentopf et Zsigmondy (1903), Cotton et Mouton, etc. D'autres travaux, en particulier ceux de Gastou, ont montré quel parti on pouvait tirer de l'ultra-microscope, spécialement dans le diagnostic de la syphilis.

Utilisation bactériologique. — L'ultra-microscope est surtout utilisé pour examiner à l'état frais des microbes invisibles (sans coloration) par les procédés habituels. Il est actuellement d'usage courant dans la recherche du Tréponème de la syphilis.

Dispositifs d'ultra-microscopie. — ***Appareils à fond noir.*** — C'est à ces appareils que, par abus de langage, on donne le nom d'ultra-microscopes. Leur but est d'éclairer exclusivement l'objet, en laissant le champ obscur.

Il faut pour cela réaliser l'*éclairage latéral* de l'objet (fig. 127). Les rayons lumineux, arrivant très obliquement sur l'objet, ne pénètrent pas dans l'objectif; l'objet réfléchit la lumière et, le champ étant obscur, devient visible.

Chaque constructeur a son appareil. Citons le prisme parallélipipédique oblique de Cotton et Mouton, le prisme parabolique de Zeiss, le condensateur sphérique de Leitz, le système lenticulaire de Stiassnie. Certains appareils se placent sous la platine du microscope, à la place du condensateur Abbé; les plus récents (Stiassnie, fig. 128; Leitz) sur la platine, ce qui est plus commode.

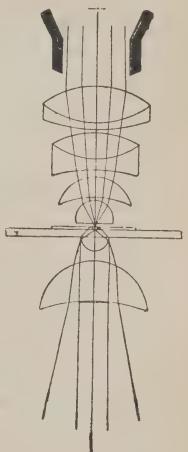

Fig. 127. — Marche des rayons dans l'ultramicroscope Stiassnie.

Diaphragme d'objectifs. — Malgré les perfectionnements, un certain nombre de rayons peuvent pénétrer dans l'objectif et éclairer le champ. Pour arrêter ces rayons égarés, on intercale au-dessus de la lentille frontale de l'objectif un diaphragme, en forme de petit abat-jour. Le diaphragme de Stiassnie peut être adapté aux objectifs ordinaires. D'autres (Leitz, Zeiss) construisent des objectifs avec diaphragme fixe.

Moyens d'éclairage. — **Source lumineuse.** — Elle doit être très puissante. On emploie communément la lampe électrique de Nernst; le bec à incandescence (fig. 128) avec réflecteur peut suffire.

Condensateur. — Indispensable pour obtenir le maximum d'éclairement.

a. Le condensateur est le plus souvent placé entre la lampe et le miroir : lentille condensatrice (Leitz), boule en verre remplie d'eau (Zeiss). Dans ce cas, le miroir doit être placé exactement au foyer optique de la lentille, qu'on détermine en cherchant avec une feuille de papier le point où se forme l'image des fils de la lampe; ce *repérage* est une petite difficulté.

b. Mieux vaut placer le condensateur ultra-microscopique à la place du condensateur Abbé, comme dans l'appareil Stiassnie.

Importance de certains accessoires. — Il faut des lames et des lamelles extrêmement propres, sans quoi elles produisent des images lumineuses; de l'huile de cèdre bien fluide et homogène. — Pour certains appareils (Zeiss), les lamelles doivent avoir une épaisseur déterminée.

Technique des examens ultra-microscopiques.

Il faut successivement : disposer régulièrement l'ensemble des appareils; centrer l'appareil à fond noir; préparer et mettre en place l'objet à examiner; mettre au point et examiner.

Disposition des appareils. — Adapter au microscope les objec-

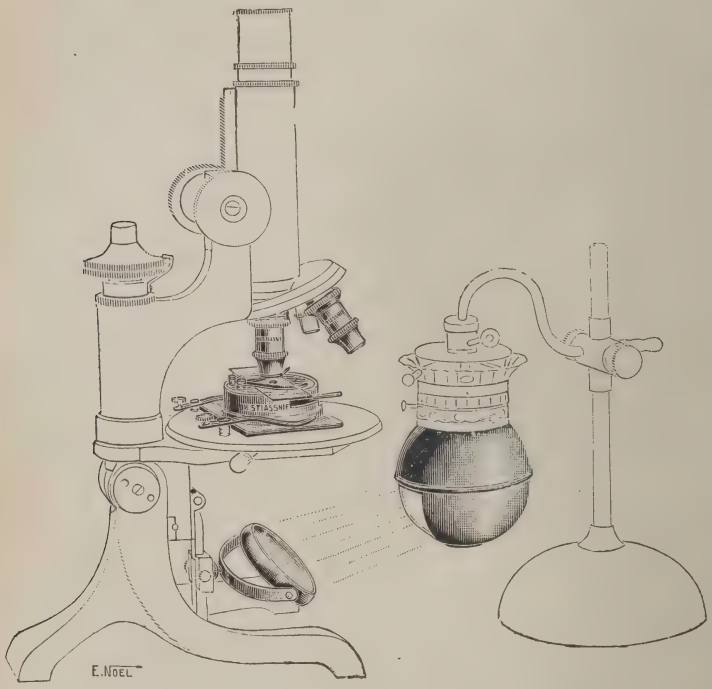

Fig. 128. — Ultra-microscope de Stiassnie.

tifs voulus : toujours au moins un objectif faible (pour centrage) et un objectif fort (pour examen). Pour les examens, on peut employer soit l'objectif à immersion, soit les objectifs à sec 7, 8 ou 9.

Assurer l'éclairage. C'est très simple avec l'appareil Stiassnie : approcher la lampe du miroir. — Avec les appareils à lentille condensatrice, il faut effectuer une fois pour toutes le repérage (Voy.

ci-dessus); le mieux est d'utiliser un banc optique donnant la place de chaque pièce.

Donner au miroir l'inclinaison voulue. Mettre en place l'appareil à fond noir.

Centrage de l'appareil à fond noir. — Les appareils actuels portent à leur face supérieure un diaphragme central. Il faut amener ce diaphragme au centre de l'ouverture de la platine.

Dans ce but, l'appareil étant placé (sur ou sous la platine, suivant les cas), examiner avec l'objectif faible : s'assurer que le centre est éclairé nettement et uniformément; sinon, déplacer légèrement l'appareil jusqu'à obtenir l'éclairage cherché.

On peut centrer avec des objectifs de force progressivement croissante

Préparation et mise en place de l'objet. — L'objet est disposé entre lame et lamelle; ces dernières doivent être tenues adhérentes par la préparation intercalée entre elles; on se gardera donc d'examiner des préparations trop fluides.

L'objet peut être examiné tel quel (sérosités syphilitiques, par exemple) ou dilué dans un liquide neutre : le meilleur est le liquide d'ascite ou d'hydrocèle.

La préparation terminée est mise en place sur la platine ou sur le condensateur, suivant les appareils.

Placer une goutte d'huile de cèdre sur la face supérieure du condensateur (sous la lame).

Pour l'objectif à immersion, déposer de l'huile de cèdre sur la lamelle, comme d'ordinaire.

Mise au point. — Tout étant disposé comme ci-dessus, abaisser lentement l'objectif d'examen à la distance habituelle, en examinant de temps à autre : le champ, d'abord légèrement éclairé, devient ensuite complètement obscur; il commence à s'éclairer à nouveau, par places, quand la mise au point est à peu près complète; on voit alors des points ou placards lumineux. Compléter la mise au point et suivre l'examen en utilisant la vis micrométrique.

Aspect normal du champ ultra-microscopique. — Sur le fond noir, brillent des images lumineuses de formes diverses : taches, points, granulations, etc. Elles sont mobiles ou immobiles. Le verre (lames et lamelles) de mauvaise qualité provoque des images immobiles. Les liquides albumineux et les tissus présentent des granulations animées de mouvements browniens. Il faut s'habituer à cet aspect *normal*.

III. — LAMES ET LAMELLES.

On emploie les lames dites *porte-objets* et les lamelles dites *couvre-objets :* diamètre habituel des lamelles, 18×18 et 22×22 millimètres.

Les lames et lamelles pour examens microscopiques doivent être rigoureusement propres. Même neuves, lames et lamelles ne sont généralement pas propres. A plus forte raison faut-il nettoyer les lames ou lamelles qui ont servi, avant de les utiliser à nouveau.

Nettoyage des lames et lamelles neuves. — Essuyer avec un linge fin. Si cela ne suffit pas, humecter avec un linge imprégné d'alcool, puis essuyer.

Nettoyage des lames et lamelles usagées. — *a.* Au fur et à mesure des manipulations, les lames et lamelles qui ont servi aux examens seront jetées dans un vase renfermant de l'alcool dénaturé.

b. Au moment voulu, enlever lames et lamelles, égoutter rapidement; placer dans une terrine renfermant nue solution de carbonate de soude) *cristaux* du commerce), approximativement 2 à 4 p. 100; faire bouillir 30 minutes.

c. Laisser refroidir, laver largement à l'eau propre; puis faire bouillir 30 minutes dans une solution d'acide chlorhydrique du commerce à 5 p. 100 environ.

d. Laver à l'eau propre, laisser égoutter. Pour les *lames* : essuyer avec un linge fin; sécher complètement; conserver à l'abri des poussières, à sec. Pour les *lamelles* : conserver dans l'alcool à 60° ou dans l'alcool-éther; essuyer au moment du besoin.

Observation. — Pour manier les lamelles, sans les casser : les tenir par les côtés, entre le pouce et l'index gauches.

IV. — CENTRIFUGEURS.

Le centrifugeur est actuellement indispensable dans un laboratoire. Il existe un grand nombre de modèles, à main, à eau, électriques. Si une vitesse modérée, 2 à 3000 tours par minute, suffit pour la centrifugation du sang, il est nécessaire, pour précipiter les microbes, de centrifuger à une vitesse de 6 à 8000 tours par minute. Il est bon de se rappeler qu'un centrifugeur donne un travail utile proportionné au diamètre moyen de la partie tournante, et au carré de la vitesse de rotation; aussi est-il plus avantageux d'augmenter la vitesse que de grandir le diamètre.

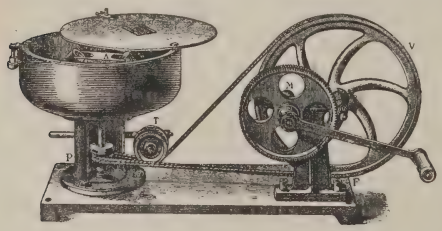

Fig. 129. — Centrifugeur Jouan (modèle F).

Signalons en particulier les centrifugeurs Jouan (fig. 129), appareils à grande vitesse, de contenance étagée entre 100 centimètres cubes et 3 litres.

CHAPITRE XV

EXAMEN MICROSCOPIQUE ET COLORATION DES MICROBES

On peut examiner au microscope les microbes des cultures ou ceux des produits pathologiques.

Cet examen peut être pratiqué : ou bien sans coloration, à l'état humide (à l'état frais); ou bien après action des colorants, à l'état humide, à l'état sec ou dans les coupes.

La coloration des microbes sur coupes est étudiée au chapitre XVI.

I. — EXAMEN SANS COLORATION A L'ÉTAT HUMIDE.

Ce mode d'examen est surtout indiqué pour apprécier la forme et la disposition réciproque des microbes, de même que leur degré et leur mode de motilité.

Examen des microbes en cultures. — 1° **Cultures liquides.** — Préparer une lame et une lamelle très propres.

Avec le fil de platine à anse, prélever aseptiquement une anse de culture; la disposer sur la lame.

Laisser tomber doucement la lamelle sur la goutte de liquide. Le liquide s'étale en couche très mince entre la lame et la lamelle. Elles doivent adhérer l'une à l'autre par simple capillarité. On évitera l'interposition de grosses bulles d'air.

Examiner avec un objectif à sec, 7 à 9 (p. 225).

Si l'examen doit être prolongé quelque temps, on peut prévenir l'évaporation en lutant à la paraffine : chauffer la pointe d'une tige métallique mince, la plonger dans un bloc de paraffine, la porter rapidement sur un angle de la lamelle; prélever à nouveau la paraffine, luter progressivement les quatre bords.

Si l'examen doit être très long, utiliser les cellules (p. 163). S'il est nécessaire de maintenir les préparations à température constante, on s'adressera aux platines chauffantes (p. 164).

2° **Cultures solides.** — Préparer une lame et une lamelle comme ci-dessus. Placer sur la lame une petite goutte d'eau physiologique.

Avec l'extrémité du fil de platine droit, détacher aseptiquement une parcelle de culture. Diluer cette parcelle dans la goutte d'eau.

Opérer ensuite comme ci-dessus.

Cette petite opération est plus délicate que la précédente ; les débutants prélèvent à peu près invariablement une quantité de culture beaucoup trop considérable.

Il faut arriver à obtenir un liquide à peine trouble.

Examen des produits pathologiques. — La technique varie suivant les cas ; nous y reviendrons à propos de la technique spéciale (Voy. en particulier *Syphilis*, *Trypanosomes*).

II. — COLORANTS ET SOLUTIONS COLORANTES.

Avant d'étudier l'examen après coloration, il faut faire connaître les colorants et solutions colorantes à employer.

Colorants. — Depuis Ehrlich, on reconnaît, parmi les matières colorantes artificielles, deux groupes : couleurs basiques et couleurs acides.

Les *couleurs basiques* sont ainsi appelées parce que, dans leur constitution, entre une base colorante combinée à un acide non colorant. Elles présentent une affinité élective pour les noyaux.

Les microbes, dont le protoplasma n'est qu'un noyau diffus, sont colorés d'une manière élective par les couleurs basiques.

En pratique, les colorations des microbes sont effectuées exclusivement avec les couleurs basiques.

Les plus importantes d'entre elles sont :

Bleus.	Rouges.	Violets.
Bleu de méthylène.	Fuchsine (ou rubine).	Violet de gentiane.
Bleu de toluidine.	Safranine.	Kristall-violet.
Bleu-azur.	Rouge neutre.	Violet-dahlia.
		Thionine (viol.de Lauth).

Verts.	Bruns.
Vert brillant.	Vésuvine (brun de Bismarck).
Vert de méthyle.	Etc.
Vert-malachite.	

Il faut connaître, en outre, les *couleurs acides*, formées d'un acide colorant combiné à une base incolore. Elles n'ont d'affinité spéciale pour aucun tissu ; elles colorent uniformément les microbes et les noyaux ou le protoplasma cellulaires.

Les principales d'entre elles sont :

L'éosine ;
L'aurantia ;
La fuchsin acide.

Renforcement du pouvoir colorant. — L'action de tous les colorants peut être renforcée :

1° par la chaleur; 2° par l'adjonction aux solutions colorantes de certaines substances déterminées empiriquement, et qu'on appelle *mordants*.

Le mordant le plus couramment utilisé est l'acide phénique; pour certains cas particuliers, le tanin, l'iode, l'aniline, la potasse, etc.

Solutions colorantes. — Il est inutile de multiplier le nombre des solutions colorantes. Mieux vaut se servir constamment de quelques bonnes solutions et apprendre à les bien connaître.

Pour l'usage courant nous recommandons les solutions suivantes :

Solutions hydro-alcooliques phéniquées. — En solution hydro-alcoolique, la plupart des colorants se conservent bien, à condition d'être protégés contre l'évaporation. On les conservera en flacons bien bouchés. Pour l'usage journalier, les flacons compte-gouttes, bouchés à l'émeri (fig. 130, à gauche), sont très commodes.

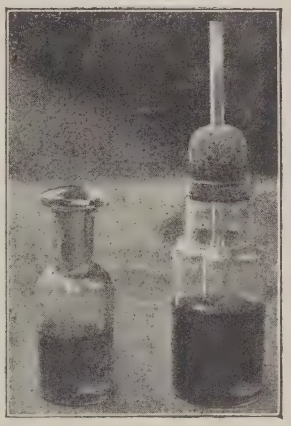

Fig. 130. — Flacons compte-gouttes.

Fuchsine phéniquée (liquide de Ziehl).

Fuchsine	1	gramme.
Acide phénique neigeux	5	—
Alcool absolu	10	cent. cubes.
Eau distillée	100	—

Triturer dans un mortier la fuchsine et l'alcool; ajouter l'acide phénique, triturer; en continuant à mélanger, ajouter petit à petit les deux tiers de l'eau ; verser dans un flacon, rincer le mortier avec le dernier tiers de l'eau, verser l'eau du rinçage dans le même flacon. Attendre vingt-quatre heures; filtrer; recueillir en flacon bouché à l'émeri.

Violet de gentiane phéniqué.

Violet de gentiane	1	gramme.
Acide phénique neigeux	2	grammes.
Alcool absolu	10	cent. cubes.
Eau distillée	100	—

Préparer comme la fuchsine phéniquée.

Kristall-violet phéniqué.

On préparerait de même le kristall-violet phéniqué, un peu moins stable que le violet de gentiane.

Thionine phéniquée (M. Nicolle).

Solution saturée de thionine dans l'alcool à 50°.	10 cent. cubes.
Eau phéniquée à 1 p. 100.....	100 —

La thionine, peu soluble dans l'alcool fort, doit être dissoute dans l'alcool à 50°.

Si l'on n'avait pas à sa disposition de thionine de bonne qualité, on pourrait la remplacer par le *bleu de toluidine phéniqué.*

Bleu de toluidine.....	1 gramme.
Acide phénique neigeux.....	4 grammes.
Alcool absolu.....	20 cent. cubes.
Eau distillée.....	200 —

Préparer comme la fuchsine phéniquée.

Bleu de méthylène phéniqué (Kühne).

Bleu de méthylène.....	2 grammes.
Acide phénique neigeux.....	2 —
Alcool absolu.....	10 cent. cubes.
Eau distillée.....	100 —

Préparer comme la fuchsine phéniquée.

Solutions aqueuses. — La seule solution aqueuse d'usage courant est la *solution d'éosine* :

Éosine (à l'eau).....	1 gramme.
Eau distillée.....	500 cent. cubes.

La plupart des autres colorants peuvent être utilisés éventuellement sous la même forme : rouge neutre, vésuvine, etc.; le titre de la solution varie suivant les circonstances.

III. — COLORATION A L'ÉTAT FRAIS.

Cette méthode permet d'étudier plus facilement les microbes vivants, grâce à la coloration, qui les teinte sans les tuer.

Il faut employer des solutions colorantes faibles; les solutions aqueuses sont généralement préférables.

Sont utilisables : le vert de méthyle, la fuchsine, le rouge neutre, etc.

Technique. — A. Porter sur lame une goutte de culture.

A côté de la culture, placer une goutte de solution colorante. Mélanger.

Couvrir d'une lamelle et examiner.

B. Autre technique : placer la culture entre lame et lamelle, comme ci-dessus. Porter sur la lame, au contact d'un bord de la lamelle, une trace de solution colorante (moins diluée que dans le cas précédent).

Examiner.

Dans les deux cas, le mélange doit être presque incolore à l'œil nu. Au microscope, les microbes apparaissent colorés sur fond clair.

Le procédé est délicat et ne réussit pas pour tous les microbes.

IV. — COLORATION A L'ÉTAT SEC, SUR LAMES.

La très grande généralité des microbes peuvent et doivent être étudiés à l'aide de deux méthodes :

1° Coloration simple ;

2° Coloration par la méthode de Gram.

Dans certains cas, il faut avoir recours à des méthodes spéciales.

La coloration des capsules, des spores et des cils demande également des méthodes particulières.

Outillage nécessaire. — Il faut avoir à portée de la main :

Les solutions colorantes, en flacons compte-gouttes ;

Divers réactifs (alcool absolu, alcool-éther, solution iodo-iodurée, etc.) ;

Huile de cèdre ;

Lames et lamelles, propres ;

Pipettes et fils de platine ;

Pissette à eau (fig. 131) ;

Cristallisoir, pour les liquides de lavage ;

Compresses, papier-filtre ;

Une flamme chauffante, d'ordinaire bec Bunsen à veilleuse.

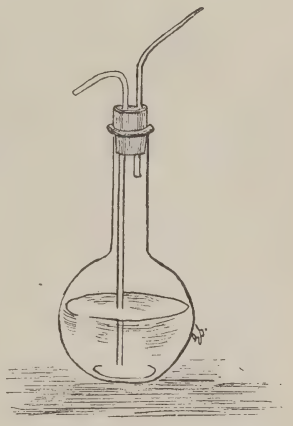

Fig. 131. — Pissette à eau.

Coloration simple.

Choix du colorant. — Pour les colorations simples, on a presque toujours intérêt à colorer par la thionine phéniquée, qui est le colorant microbien le plus électif. A défaut, on peut employer le bleu de toluidine ou le bleu de méthylène phéniqués.

Ces colorants, qui sont très électifs et qui ne surcolorent pas, sont indispensables pour les frottis, où les microbes sont mélangés aux éléments cellulaires et aux débris de tissus.

Exceptionnellement, pour des microbes difficiles à colorer, il est préférable d'employer la fuchsine phéniquée, diluée au 10e dans l'eau.

Coloration des microbes en cultures. — 1° Méthode directe. — La méthode directe est applicable avec tous les colorants et à tous les microbes.

a. *Étalement.* — A l'aide du fil de platine, porter sur une lame une anse de culture en milieu liquide, ou une émulsion de culture sur milieu solide, comme il a été indiqué ci-dessus (p. 233). Étaler en couche mince, régulière.

b. *Dessiccation.* — Sécher. Pour hâter la dessiccation, chauffer légèrement à quelque distance au-dessus de la veilleuse ; pour éviter la formation de cercles concentriques, agiter constamment le liquide avec le fil de platine jusqu'à dessiccation.

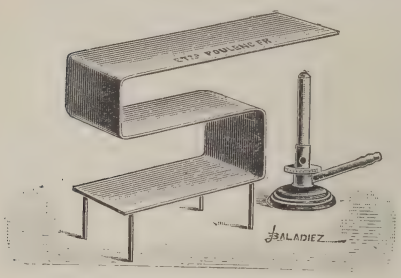

Fig. 132. — Platine chauffante.

Pendant cette opération, chauffer avec prudence pour ne pas déformer les microbes : la température de la lame doit demeurer supportable au contact de la face dorsale des doigts.

On peut également sécher sur la platine chauffante (fig. 132).

c. *Fixation.* — α. Habituellement on fixe *par la chaleur.*

La lame étant tenue par une extrémité, la passer trois fois dans la flamme, face enduite en haut, à vitesse modérée, « comme en coupant du pain ».

Ce temps, sans être délicat, demande un peu d'habitude.

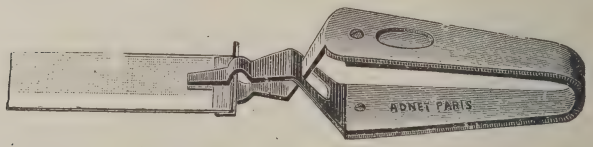

Fig. 133. — Pince de Debrandt.

Pour cette opération et pour les suivantes, on s'exercera à tenir les lames à la main. Sinon on utilisera la pince de Debrandt (fig. 133).

β. On peut fixer par l'*alcool éther* : parties égales d'alcool absolu et d'éther rectifié. Faire tomber sur la préparation quelques gouttes d'alcool-éther ; laisser évaporer.

d. *Coloration.* — Verser sur la préparation la quantité de thionine phéniquée nécessaire pour couvrir complètement ; laisser agir une demi-minute à une minute. Égoutter le colorant.

Laver rapidement à l'eau avec la pissette.

Sécher. Éponger l'excès d'eau entre deux feuilles de papier-filtre. Compléter la dessiccation comme au temps *b*.

e. *Examen.* — Mettre sur la préparation une goutte d'huile de cèdre. Examiner avec l'objectif à immersion.

Si la préparation doit être conservée, étiqueter. Enlever l'huile de cèdre en lavant au xylol. Conserver dans une boîte à préparations, à l'abri des poussières.

A la longue, les préparations à la thionine se décolorent plus ou moins ; la fuchsine tient mieux.

2° **Méthode régressive.** — La méthode régressive est applicable exclusivement avec la thionine ; elle donne des préparations très claires.

a à *d*. Comme ci-dessus.

e. Faire agir rapidement l'alcool absolu. Laver à l'eau, etc.

Coloration des microbes sur frottis. — La méthode régressive est presque toujours préférable.

a. *Étalement.* — Pour les pulpes d'organes (foie, rate, etc.) : disposer un fragment d'organe sur une lame : avec une autre lame, écraser et étaler. Pour les produits pathologiques, voir *Analyse du pus, du sang*, etc.

b. *Dessiccation* : Comme ci-dessus.

c. *Fixation.* — Fixer de préférence par l'alcool-éther ou l'alcool absolu, en ayant soin de s'assurer si ce dernier est réellement absolu (Voy. p. 250). La chaleur, altérant beaucoup les éléments cellulaires, est ici inférieure aux fixateurs précédents.

d. *Coloration* : comme ci-dessus. Laisser agir la thionine une à deux minutes, suivant l'épaisseur du frottis.

e. Faire agir rapidement l'alcool.

f. Laver à l'eau, sécher, examiner.

Variantes. — 1° On peut examiner sous l'eau, entre lame et lamelle, ce qui permet parfois de mieux saisir certains détails de morphologie.

Opérer comme ci-dessus, *a* à *d* ; à la fin du temps *d*, laisser sur la préparation une goutte d'eau.

e. Poser sur la goutte d'eau une lamelle, enlever soigneusement l'excès d'eau qui peut déborder de la lamelle (avec du papier-filtre).

f. Mettre sur la lamelle de l'huile de cèdre. Examiner à l'immersion.

2° Certains auteurs, de plus en plus rares, préfèrent colorer sur lamelle. Le procédé est plus délicat et sans avantage.

Saisir la lamelle avec une pince Cornet ou une pince Debrandt. Opérer ensuite comme ci-dessus. Au temps *e*, déposer sur une lame une goutte de baume du Canada ; renverser la lamelle sur le baume ; appuyer légèrement. Déposer une goutte d'huile de cèdre sur la lamelle, examiner

Coloration par la méthode de Gram.

Indications. — Employée dans un but de diagnostic, elle doit être appliquée invariablement à tout microbe dont on fait l'étude.

Principe. — L'action successive des dérivés basiques de la pararosaniline (on emploie généralement le violet phéniqué) et de la solution iodo-iodurée détermine la formation d'un composé iodé, qui se fixe très énergiquement sur certaines bactéries et ne se fixe pas sur d'autres bactéries, ni sur les tissus. Un lavage ultérieur par un dissolvant approprié ne décolore pas les premières, alors qu'il décolore les seconds.

Coloration des microbes en culture. — ***Procédé de choix***.— *a* à *c*, comme pour la coloration simple.

d. Verser sur la préparation la quantité de violet phéniqué (violet de gentiane ou kristall-violet) nécessaire pour couvrir complètement ; laisser agir trente secondes.

e. Égoutter le colorant. Sans laver, verser quelques gouttes de solution iodo-iodurée forte. Laisser dix à douze secondes. Égoutter la solution, renverser une nouvelle quantité, laisser le même temps.

Solution iodo-iodurée forte (Nicolle) :

Iode	1 gramme.
Iodure de potassium	2 grammes.
Eau distillée	200 —

Dissoudre l'iodure de potassium dans quelques centimètres cubes d'eau ; ajouter l'iode, dissoudre ; ajouter peu à peu le reste de l'eau.

f. Égoutter. Sans laver, en inclinant légèrement la lame, verser goutte à goutte la solution suivante (M. Nicolle) :

Alcool absolu	5 parties.
Acétone	1 partie.

La solution se colore en violet ; continuer le lavage pendant quelques secondes, jusqu'à ce qu'elle passe incolore.

Ce dernier temps, décoloration, est le seul un peu délicat. Il demande un peu d'habitude.

g. A ce moment, *la réaction de Gram est terminée*. Il est presque toujours indiqué de recolorer.

Dans ce but, on fait agir pendant cinq à huit secondes la solution suivante :

Liquide de Ziehl.....	1 partie.
Eau distillée.....	100 parties.

h. Laver. Sécher. Examiner.

Remarques. — Le temps *g* n'est pas indispensable quand on est sûr d'avoir affaire à une culture pure

En tout autre cas, la recoloration doit être pratiquée.

On peut substituer à la fuchsine un autre colorant de fond, faisant contraste avec le violet (éosine aqueuse, safranine, etc.).

La durée indiquée pour chacun des temps est une moyenne. Certains microbes (Staphylocoque) se colorent et fixent très vite; d'autres (Bacille de Lœffler) plus lentement. Une erreur assez commune chez les débutants consiste à vouloir opérer trop vite, ce qui peut fausser les résultats.

Certains microbes, difficilement colorables, prennent le Gram à condition de prolonger l'action des réactifs (Voy. *Méthode de Much*).

Résultats. — Après application de la technique ci-dessus, certains microbes restent colorés en violet foncé ; on dit qu'*ils prennent le Gram*, qu'*ils restent colorés par la méthode de Gram*.

D'autres microbes ne gardent pas la couleur violet foncé ; si on a pratiqué la recoloration (temps *g*), ils sont colorés en rouge. On dit qu'*ils ne prennent pas le Gram*, qu'*ils se décolorent par la méthode de Gram*.

Prennent le Gram :

Staphylocoque.	Pneumocoque.	Vibrion septique.
Streptocoque.	Bacille diphtérique.	Bacille du tétanos.
Entérocoque.	Bactéridie charbonneuse.	Etc.

Ne prennent pas le Gram

Gonocoque.	Bacilles paratyphiques.	Bacille dysentérique.
Méningocoque.	Colibacille.	Vibrion cholérique.
Bacille typhique.	Bacille de la peste.	Etc.

Variante. — 1. La *méthode primitive de Gram* comportait une coloration par le violet aniliné pendant cinq minutes; puis action de la solution de Lugol :

Iode.....	1 gramme.
Iodure de potassium.....	2 grammes.
Eau.....	300 cent. cubes.

Enfin décoloration par l'alcool.

Coloration des microbes sur frottis. — Dans les frottis, les microbes se trouvent généralement englobés dans une substance albuminoïde qui met obstacle à l'action des réactifs ; aussi faut-il laisser agir ces derniers un peu plus longtemps.

De plus, il est toujours indispensable de recolorer le fond de la préparation par une couleur faisant contraste, tant pour apprécier les rapports des microbes avec les cellules que pour permettre de déceler à la fois les microbes qui prennent le Gram et ceux qui ne le prennent pas.

Technique. — *a*, *b*, *c*. Comme ci-dessus.

d. Faire agir le violet phéniqué quarante secondes.

e. Égoutter le colorant. Sans laver, verser quelques gouttes de solution iodo-iodurée forte. Laisser quinze secondes. Égoutter, reverser de la solution ; laisser à nouveau quinze secondes.

f. Egoutter. Sans laver, décolorer par l'alcool-acétone, en versant goutte à goutte jusqu'à ce que ce dernier passe incolore.

Le fond de la préparation ne doit pas garder une teinte violacée.

g. Comme dans l'opération précédente.

Méthode de Claudius. — Les agents de différenciation et de décoloration ne sont pas les mêmes que pour la méthode de Gram, mais les résultats obtenus sont identiques, et la technique n'est pas simplifiée ; aussi la méthode de Claudius n'a-t-elle pas détrôné celle de Gram.

a. Colorer au violet de méthyle (solution aqueuse à 1 p. 100), une minute.

b. Laver à l'eau, étancher au papier-filtre ; faire agir une minute la solution picriquée :

Acide picrique (solution saturée).....	1 partie.
Eau distillée.....	1 —

c. Sécher au papier-filtre. Porter dans un vase clos renfermant du chloroforme ; laisser tant que la décoloration se poursuit.

d. Sécher, monter au baume du Canada.

Méthodes spéciales.

Coloration des bacilles acido-résistants. — *Méthode d'Ehrlich.* — Certains microbes, bacilles de la lèpre, de la tuberculose, etc., *se colorent difficilement par les couleurs d'aniline ; mais une fois colorés, ils retiennent énergiquement la couleur.*

C'est sur ce principe général, posé par Ehrlich, qu'est basée la coloration élective de ces microbes. On colore très fortement (à chaud, ou pendant longtemps) à l'aide d'une couleur basique : liquide de Ziehl, violet phéniqué, etc. ; on décolore ensuite avec un agent énergique : acide sulfurique ou azotique dilués, acides or-

ganiques, chlorhydrate d'aniline, etc. Dans ces conditions, seuls restent colorés les Bacilles dits acido-résistants.

Les détails de la méthode seront exposés plus loin.

Coloration par l'éosine-bleu. — Romanowsky a montré qu'en mélangeant en proportions déterminées des solutions d'éosine (à l'eau) et de bleu de méthylène, on obtient un colorant réellement nouveau : le mélange présente les affinités tinctoriales de l'éosine d'une part, du bleu d'autre part, et il colore en outre d'une teinte particulière, gris bleuté, certains éléments parasitaires (entre autres l'hématozoaire du paludisme).

Les détails de la méthode, telle qu'elle est appliquée actuellement (procédés de Laveran, de Giemsa, etc.) seront exposés plus loin.

Coloration des capsules.

Divers microbes, Pneumocoque, Pneumobacille, sont entourés d'une zone claire, réfringente, ou capsule.

La capsule est visible à l'état frais, sans coloration.

Un peu réfractaire aux colorants, elle est mise en évidence par application des procédés habituels de coloration, quand le fond de la préparation est albumineux (milieux albumineux, frottis) ; la capsule apparaît alors *incolore (capsules négatives)* sur un fond coloré.

On peut, d'autre part, colorer les capsules par divers procédés.

1° **Procédé de choix.** — Préparer les lames comme d'ordinaire.

a. Colorer par la fuchsine phéniquée, une à deux minutes ; laver.

b. Porter vingt à quarante secondes dans une solution d'acide acétique à 1 p. 100.

c. Laver, sécher ; huile de cèdre.

Les microbes sont rouge vif ; les capsules, rosées.

2° On peut se contenter (Nicolle et Remlinger) de colorer par le violet phéniqué pendant quatre à six secondes et de faire agir ensuite rapidement l'alcool-acétone au tiers. — Microbes, violet foncé ; capsules, violet pâle.

3° **Procédé de Ribbert.** — On incorpore à la solution colorante un agent de décoloration (acide acétique) :

Eau distillée	100 parties.
Acide acétique	1
Alcool absolu	50
Violet-dahlia	A saturation, à chaud.

Colorer rapidement (quelques secondes).

4° Pour les microbes capsulés *prenant le Gram*, on peut utiliser l'un des procédés suivants :

Procédé de Rosenow. — 1° Plonger la lame dans une solution de tanin de 5 p. 100, dix à vingt secondes.

2° Laver, colorer au violet de gentiane, à chaud, une minute.

2° Laver, faire agir le liquide de Gram, trente secondes.

4° Décolorer par l'alcool à 95°.

5° Recolorer par l'éosine en solution alcoolique saturée, laver.

Le Pneumocoque est brun sombre ; la capsule, rouge.

Procédé de Wadsworth. — Analogue au précédent.

Fixer au formol, deux à cinq minutes. Colorer deux minutes au violet aniliné (voy. plus loin). Traiter deux minutes par le liquide de Gram. Décolorer par l'alcool à 95°. Recolorer par la fuchsine en solution aqueuse.

Coloration des spores.

Les spores, très réfringentes, sont visibles sans coloration.

Sur les préparations colorées par les méthodes courantes, elles demeurent *incolores* et tranchent sur les corps microbiens, colorés.

Elles sont difficiles à colorer ; mais, une fois colorées, elles résistent fortement à la décoloration. Comme la difficulté de coloration est due à la résistance de la membrane d'enveloppe, on doit forcer au préalable cette dernière par un artifice quelconque ; on emploie, dans ce but, la chaleur ou les agents chimiques.

La résistance aux agents décolorants permet d'obtenir une double coloration. Il faut toujours avoir recours à cette dernière, qui met en évidence les caractères nécessaires pour différencier les spores des formes d'involution ou de dégénérescence.

Les procédés de décoloration employés sont les mêmes que pour les bacilles acido-résistants.

Procédé de Mœller. — *Procédé de choix.*

a. Préparer les lames comme d'habitude; fixer à l'alcool absolu.

b. Plonger pendant cinq minutes dans une solution aqueuse d'acide chromique à 5 p. 100. Laver.

c. Colorer à la fuchsine phéniquée, soit à chaud, pendant cinq à dix minutes vers 60° ; soit à froid, pendant cinq heures.

d. Décolorer par l'aniline chlorhydrique à 2 p. 100 (Voy. plus loin) ; compléter la décoloration par l'alcool absolu, laver ;

e. Recolorer par le Kühne dilué à 1 p. 3.

Les spores sont rouges; les corps bactériens sont bleus.

Variantes. — 1° Au temps *d*, on peut sans inconvénient employer comme décolorant soit l'acide sulfurique à 4 ou 5 p. 100 (formule

primitive du procédé Mœller), soit l'acide nitrique à 10 ou 20 p. 100. L'alcool absolu suffit pour quelques espèces.

2° On peut substituer à l'acide chromique (temps *b*) d'autres agents chimiques. Pour toutes les méthodes suivantes, les autres temps comme ci-dessus, sauf indication contraire.

Procédé d'Aryesky. — Acide chlorhydrique à 0,5 p. 100, à chaud.

Procédé de Thesing. — Chlorure de platine à 1 p. 100, à chaud.

Procédé d'Orszag :

Salicylate de soude, solution à 0,5 p. 100....	4 parties.
Acide acétique, solution à 5 p. 100.....	1 partie.

Placer une goutte du mélange sur la lame; y ajouter la culture, délayer, sécher, fixer. Le reste comme plus haut.

3° L'*action de la chaleur* suffit à rendre les spores colorables : traiter par la chaleur humide (autoclave) à 120° pendant une heure (Buchner) ; ou, plus simplement, par la chaleur sèche, en passant dix fois de suite dans la flamme de Bunsen (Hüeppe). Colorer ensuite au violet.

La chaleur, poussée à ce degré, altère sensiblement les corps microbiens, qui se colorent moins que les spores. Le procédé est défectueux.

Coloration des cils.

Les cils de certaines grosses bactéries (sulfo-bactéries) sont visibles à l'examen direct. Au contraire, les cils des espèces pathogènes ne sont visibles qu'après coloration. Ceux du Vibrion cholérique et de quelques espèces voisines peuvent être teintés par une méthode simple; dans tous les autres cas, il faut s'adresser à des méthodes spéciales.

Méthode simple. — Procédé de Strauss. — Le procédé de Strauss est applicable *exclusivement aux vibrions* : Vibrion cholérique, *Vibrio Metchnikovi*, Vibrion de Finkler et Prior. Il ne réussit pas à colorer les cils d'autres espèces, Colibacille, Bacille typhique, etc.

Porter sur lame une goutte de culture jeune en bouillon. Ajouter une goutte de fuchsine phéniquée, diluée au cinquième; mélanger. Couvrir d'une lamelle. Examiner à l'immersion.

Quand la préparation est réussie, on voit les cils faiblement teintés en rose.

Méthodes spéciales. — Sauf le cas précédent, les cils ne peuvent être colorés qu'après mordançage énergique, toutes les substances organiques de la préparation se colorent en même temps. Aussi faut-il éliminer autant que possible tout ce qui n'est pas le corps microbien.

Il est prudent d'opérer comme suit :

1° Prélever la surface de cultures jeunes (douze heures au plus) sur gélose, sans entamer le milieu ; diluer dans l'eau de conduite filtrée, en quantité telle que l'émulsion soit *à peine* opalescente.

2° Si l'on a le temps, il vaut mieux émulsionner la culture dans le formol à 3 ou 4 p. 100 ; laisser les microbes se déposer au fond ; décanter, émulsionner le dépôt dans le formol à 1 p. 100 ; laisser déposer, émulsionner le dépôt dans l'eau de conduite, étaler sur lames.

3° On peut saisir la lame à l'un des angles (toujours le même) de l'extrémité libre, ou se servir d'une pince Debrandt : en tous cas, la maintenir inclinée, de manière que les réactifs ne puissent baigner les doigts ou la pince. Éviter surtout que les réactifs ne viennent lécher les doigts (riches en matière organique).

4° Employer des lames d'une rigoureuse propreté ; au besoin, laver à l'acide chlorhydrique, puis rincer à l'eau distillée fraîche ; conserver dans l'alcool ou l'alcool-éther. Au dernier moment, il est bon de les passer une vingtaine de fois dans la partie la plus chauffante du bec Bunsen, Laisser refroidir complètement.

5° Répartir sur la lame des gouttelettes extrêmement fines de l'émulsion, bien séparées ; laisser sécher à la température ambiante, à l'abri des poussières. Si la lame est bien propre, les gouttelettes s'étalent régulièrement.

La fixation peut altérer un peu les cils. On peut ne pas fixer, mais il faudra alors être prudent dans les manipulations ultérieures : les lavages seront effectués très légèrement.

Procédé de Van Ermengem. — Ce procédé donne des résultats réguliers. Il est basé sur la réduction du nitrate d'argent fixé au préalable sur les cils.

a. Plonger la lame pendant trente minutes à froid ou cinq minutes à 60° dans le *bain fixateur* :

Acide osmique à 2 p. 100.....	33 centimètres cubes.
Tanin à 20 p. 100.....	66 —
Acide acétique.....	IV ou V gouttes.

b. Laver soigneusement à l'eau distillée, puis à l'alcool.

c. Faire agir pendant quinze à trente secondes le *sensibilisateur* : solution de nitrate d'argent à 0,5 ou 1 p. 100.

d. Sans laver, plonger une à deux minutes dans le *bain réducteur* :

Acide gallique.....	5 grammes.
Tanin	3 —
Acétate de soude fondu.....	10 —
Eau distillée.....	350 centimètres cubes.

e. Plonger dans le bain de nitrate d'argent, jusqu'à ce que le bain noircisse.

f. Laver, sécher, examiner.

Si la coloration n'est pas suffisante, traiter à nouveau d'abord par le réducteur, puis par le sensibilisateur.

Variantes. — **Procédé de Stephens.** — Identique au Van Ermengem, sauf substitution au nitrate d'argent de la largine à 2 p. 100.

Procédé de Zettnov. — *Procédé recommandé.* — Ce procédé, assez long, donne de très belles préparations.

A. *Mordant.* — Il faut dissoudre :

I. 1 gramme de tartre stibié dans 15 centimètres cubes d'eau.

II. 5 grammes de tanin dans 100 centimètres cubes d'eau.

A la solution II tiédie vers 40°, on ajoute peu à peu de la solution I, jusqu'à ce que le précipité qui se forme ne se dissolve plus. Filtrer ensuite sur papier. Le mordant doit être opalescent à froid et transparent à chaud. Il se conserve plusieurs semaines.

B. *Oxyde d'argent.* — Dans 30 centimètres cubes d'eau, faire dissoudre 5 grammes de nitrate d'argent, puis 5 grammes de sulfate de magnésie cristallisé ; il se forme un précipité de sulfate d'argent. Laisser reposer trente minutes ; décanter, laver trois fois de suite avec 20 centimètres cubes d'eau distillée. On verse alors le précipité dans un flacon opaque, avec 0cc,50 d'eau distillée ; on agite très souvent pendant une heure. Ainsi est obtenue une solution saturée de sulfate d'argent ; le sel en excès se dépose. Conserver la solution à l'obscurité.

Au moment de l'emploi, prélever la quantité voulue de la solution argentique ; additionner de moitié d'eau ; ajouter goutte à goutte d'une solution aqueuse à 10-30 p. 100 d'éthylamine, jusqu'à ce que le précipité d'oxyde d'argent qui s'est formé se redissolve dans un excès d'éthylamine. — Ajouter alors goutte à goutte de la solution de sulfate d'argent, arrêter au moment où le précipité formé hésite à se redissoudre instantanément.

C. *Renforçateur.* — Chlorure d'or, solution à 1 p. 2000.

D. *Réducteur.* — Comprend deux solutions :

a. Pyrogallol..... 1 gr.
Alcool..... 20 cc.
Acide acétique..... II gouttes.

b. Soude cristallisée, solution aqueuse à 2 p. 100.

Technique. — 1° Les préparations, fixées par la chaleur après le traitement indiqué ci-dessus (*Méthodes spéciales*, 2°), sont mordancées dans la solution A, pendant dix minutes à 60°-70° ; ou, ce qui vaut mieux, on les place dans la solution à 70° et on les y abandonne jusqu'à refroidissement. Laver à l'eau.

2° On traite ensuite par la solution d'oxyde d'argent, une demi-minute à une minute, en chauffant légèrement. Laver rapidement.

3° Faire agir le chlorure d'or, une à deux minutes. Laver.

4° Pour réduire, verser sur la lame deux gouttes de la solution *a* et six gouttes de la solution *b* ; chauffer, laisser une minute. Répéter une deuxième fois la même opération. Laver, sécher, etc.

Procédé de M. Nicolle et Morax. — *Procédé recommandé.* — Ce procédé est une simplification du procédé de Lœffler. Lœffler ajoutait à son mordant une solution alcaline ou une solution acide, suivant les microbes. Cette addition est inutile.

Préparer l'*encre de fuchsine* de Lœffler :

Tanin, solution aqueuse à 20 p. 80.	10 centimètres cubes.
Sulfate ferreux, solution aqueuse saturée à froid.....	5 —
Fuchsine, solution saturée dans l'alcool absolu.....	1 centimètre cube.

b. Verser sur la préparation une grosse goutte d'encre de fuchsine. Laisser agir deux ou trois minutes à froid. Laver.

c. Verser à nouveau de l'encre de fuchsine. Chauffer doucement jusqu'à dégagement de vapeurs. Incliner la lame pour verser le réactif. Laver.

Recommencer trois fois la même opération. Laver largement.

d. Couvrir la préparation de fuchsine phéniquée; chauffer jusqu'à production de vapeurs; laisser dix à quinze secondes; laver.

Renouveler la même coloration.

e. Laver, laisser sécher, examiner.

Procédé de Remy et Sugg. — Modification du Lœffler, en vue d'éviter les précipités.

Mordancer à l'encre de fuchsine à froid, quinze à trente minutes.
Égoutter; faire agir le liquide de Gram.
Laver à l'eau, puis à l'alcool.
Colorer trente minutes à 37°, avec :

Eau d'aniline.....	20 centimètres cubes.
Violet de gentiane, sol. alcoolique.	1 goutte.
Eau distillée.....	5 centimètres cubes.

Laver, sécher.

CHAPITRE XVI

COUPES BACTÉRIOLOGIQUES

L'examen bactériologique des coupes a pour but tout à la fois de déceler les microbes et d'étudier les lésions.

Cet examen ne peut être fait utilement qu'après coloration. Il faut d'abord traiter les pièces comme on le fait en histologie : prélever, fixer, inclure ; puis débiter en coupes, coller ces dernières sur lames, enfin colorer.

Prélèvement. — Les pièces qu'on désire couper seront prélevées aussi fraîches que possible : chez l'animal en expérience, sitôt après la mort. Chez l'homme, seules les pièces opératoires peuvent être fraîches ; pour les autopsies, on est forcé de respecter les délais légaux, et les pièces qu'on y prélève présentent toujours des altérations dites cadavériques.

On coupera des fragments avec des instruments très propres. Leur épaisseur ne dépassera jamais 6 ou, au grand maximum, 10 millimètres ; il est presque toujours possible de limiter à 5 ou 6 millimètres. Les deux autres dimensions peuvent atteindre sans inconvénient 1 à 2 centimètres.

Fixation. — Sitôt prélevés, les pièces seront fixées.

Les agents fixateurs doivent respecter à la fois les tissus et les microbes. Certains fixateurs employés en histologie, fixant mal les microbes, ne sont pas applicables. On s'adressera de préférence à l'alcool, au sublimé ou au formol.

Quel que soit le fixateur employé :

Noyer la pièce dans une grande quantité de liquide (au moins vingt-cinq fois son volume) ;

Placer au fond du récipient une couche de coton hydrophile, pour permettre l'imprégnation sur toutes les faces.

Alcool. — *a*. Plonger les pièces pendant vingt-quatre heures dans l'alcool à 60° ou 70° ;

b. Enlever, plonger dans l'alcool à 80° ou 90°, même durée ;

c. Enlever, plonger dans l'alcool absolu, un à deux jours.

L'alcool fixe bien les bactéries, mais assez mal les tissus, qu'il rétracte. De plus il durcit beaucoup, ce qui gêne le débitage des coupes quand le tissu renferme beaucoup de tissu conjonctif dense ou de tissu musculaire. Il est suffi ant dans la majorité des cas.

Des fragments très petits peuvent à la rigueur (mauvaise fixation) être placés directement dans l'alcool absolu.

On se méfiera de l'alcool dit « absolu » du commerce. Si l'alcool est absolu, il ne fait pas émulsion quand on le mélange au xylol. On peut déshydrater l'alcool en y plongeant un sachet renfermant du sulfate de cuivre desséché (blanc). En s'hydratant, le sel de cuivre devient bleu.

Sublimé. — C'est le meilleur fixateur. On utilisera de préférence le *sublimé acétique* :

Sublimé.....	4 à 5 grammes.
Acide acétique glacial.....	1 centimètre cube.
Eau.....	100 centimètres cubes.

La solution est instable : à préparer au moment du besoin.

a. Plonger la pièce dans la solution fixatrice ; laisser séjourner jusqu'à ce qu'elle soit complètement opaque (temps variable ; quelques heures à vingt-quatre heures).

b. Enlever ; plonger dans l'alcool à 70° additionné de teinture d'iode jusqu'à teinte brune. L'iode dissout le sublimé en excès. Si l'alcool se décolore, ajouter à nouveau de la teinture d'iode, jusqu'à ce que la coloration persiste. Temps moyen : vingt-quatre heures.

c. Enlever ; porter dans l'alcool à 80°.

L'addition d'iode au temps *b* est indispensable, sans quoi le sublimé se dépose dans les coupes et donne des cristaux, gênants pour l'observation.

Pour manipuler, au cours des fixations par le sublimé, faire usage d'instruments non métalliques (corne, bois, verre).

Formol. — Le formol convient à tous les tissus, y compris le système nerveux ; la fixation est imparfaite, mais suffisante pour les besoins courants.

Préparer la solution fixatrice en diluant le formol du commerce dans l'eau salée à 7,5 p. 1 000, en proportions variables : 6 à 8 p. 100 dans la plupart des cas ; 10 p. 100 pour le système nerveux.

Porter la pièce dans la solution de formol. La fixation est obtenue en six à vingt-quatre heures, suivant le volume du fragment.

Conservation. — Si elles ne sont pas incluses de suite, les pièces fixées par l'alcool ou le sublimé seront conservées dans l'alcool à 80° (non dans l'alcool fort, qui les rend cassantes). Fixées au formol, elles peuvent être conservées ou dans la solution fixatrice même ou dans l'alcool à 80°.

Inclusion à la paraffine. — Pour obtenir des coupes fines utilisables en bactériologie, il faut inclure les pièces, c'est-à-dire

les imbiber d'une substance liquide susceptible d'être solidifiée. On s'adresse à peu près exclusivement à la paraffine ; d'autres procédés utilisés en histologie (collodion et celloïdine entre autres) ne permettent pas d'obtenir des coupes assez fines.

I. Il existe diverses variétés et diverses qualités de paraffine. Les variétés sont caractérisées par leur point de fusion; il faut se munir de deux échantillons au moins, fusibles l'un vers 45°-50° (*paraffine molle*), l'autre vers 55° (*paraffine demi-molle*). On rejettera toute paraffine non homogène, cassante ; une paraffine de bonne qualité doit être souple.

II. La plupart des échecs dans la pratique des inclusions viennent de ce que les pièces ne sont pas suffisamment déshydratées ; la paraffine, insoluble dans l'eau, les pénètre mal. La déshydratation doit être complète ; mieux vaut pécher par excès que par défaut.

III. Certains tissus (derme cutané, tissu conjonctif dense, tissu musculaire) se laissent mal imbiber par les liquides : on augmentera de moitié la durée des temps indiqués ci-dessous ; les fragments seront très petits.

IV. La paraffine est soluble dans le *xylol*, le *toluène*, le *chloroforme*, etc., liquides utilisables pour l'inclusion. On emploie d'ordinaire le xylol.

Technique. — Pour chacun des temps de l'inclusion, nous indiquerons la durée minima approximative de séjour dans chaque liquide pour trois sortes de pièces : petites (environ 1 millimètre de côté), moyennes (5 millimètres), grosses (10 millimètres). — Nous supposons partir d'une pièce placée dans l'alcool à 80°.

Déshydratation. — *a.* Porter dans l'alcool à 90°.

Pièces petites : 6 heures ; moyennes : 12 heures ; grosses : 24 heures.

b. On plonge ensuite dans l'alcool absolu.

Pièces petites : 4 heures ; moyennes : 12 heures ; grosses : 24 heures.

S'assurer au préalable que l'alcool est absolu (Voy. p. 250).

Imbibition par le xylol. — *c.* Au sortir de l'alcool absolu, placer dans le xylol.

Petites pièces : 1 heure et demie ; moyennes : 3 heures ; grosses : 6 heures.

On reconnaît que l'objet est entièrement imprégné de xylol quand il est devenu uniformément translucide. Si les durées indiquées ne suffisent pas, prolonger davantage.

Ces trois temps s'effectuent d'ordinaire à la température ambiante.

Imbibition par la paraffine. — *d.* Porter ensuite dans un mélange de xylol et de paraffine molle, à l'étuve à 37°. Parties égales de chaque substance, ou deux tiers de xylol pour un tiers de paraffine.

Pièces petites : 1 heure ; moyennes : 3 heures ; grosses : 6 heures.

e. Plonger enfin dans la paraffine molle pure, fondue, vers 50°-55° ; porter à l'étuve à 50°-55° ; ne jamais dépasser 60° (coagulation de l'albumine).

Petites pièces : 1 demi-heure ; moyennes : 2 heures ; grosses : 3 heures.

La température nécessaire au temps *e* altère un peu les tissus ; on ne maintiendra pas les pièces au delà de la durée indiquée.

Moulage. — *f.* Reste à enrober la pièce dans un bloc de paraffine. On utilise dans ce but un moule.

Moules à paraffine. — Il est facile de fabriquer les moules soi-même. Prendre un bouchon cylindrique dont le diamètre dépasse du tiers au moins celui de la pièce ; enrouler autour du bord supérieur un papier épais taillé *ad hoc*, de façon à constituer un cylindre de 2 centimètres de hauteur ; fixer avec une épingle ou du fil.

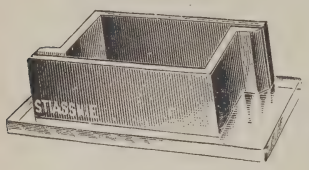

Fig. 134. — Moule à paraffine.

On peut s'ingénier à d'autres expédients : utiliser par exemple des boîtes en papier, ou en carton ; ou des capsules à bouteille, en étain.

Le mieux est de se servir du moule de Leuckardt (fig. 134) ; deux fortes lames métalliques en L. Accolées par leurs petites branches, elles forment une cuve dont on variera la longueur suivant les besoins. Placer le moule sur une lame de verre, formant fond.

Technique du moulage. — Faire fondre de la paraffine dans une capsule en porcelaine. On prendra en été une paraffine fusible à 55° ; en hiver, de la paraffine molle. Attendre qu'une pellicule se forme à la surface.

A ce moment, enlever la pièce de l'étuve à 55° ; verser dans le moule la paraffine de la capsule ; y plonger doucement la pièce, et assurer à cette dernière l'orientation voulue à l'aide d'aiguilles chauffées ; au besoin, maintenir les aiguilles en place jusqu'à ce que la paraffine commence à devenir opalescente.

Quand la surface est devenue opalescente, transporter le moule — sans le comprimer — dans un bain d'eau froide (cuvette plate, cristallisoir), en prenant soin de ne pas mouiller la face libre du bloc.

Dès que la masse est devenue solide, écarter le moule. Le bloc, renfermant la pièce, est prêt à être coupé.

Débitage des coupes. — Les pièces incluses dans les moules seront coupées à l'aide des microtomes habituellement employés en histologie. Nous ne pouvons les décrire ; signalons le modèle le plus courant : microtome Minot (fig. 135). Les coupes auront une épaisseur de 1/200 à 1/500 de millimètre.

Collage des coupes ; enlèvement de la paraffine. — Les coupes bactériologiques sont en général trop délicates pour se prêter

à des manipulations directes. Il faut les coller (les fixer) sur une lame porte-objet. Il sera ensuite nécessaire d'enlever la paraffine, pour permettre la pénétration des solutions colorantes.

Collage. — On se servira de l'*albumine glycérinée, albumine de Mayer.*

Elle se prépare comme suit : prendre un blanc d'œuf, mélanger avec partie égale de glycérine ; battre fortement, mettre à filtrer sur papier-filtre ordinaire (la filtration est très lente, 24 à 48 heures au moins). Ajouter au filtrat un cristal de thymol pour assurer la conservation. Conserver en flacon bien bouché.

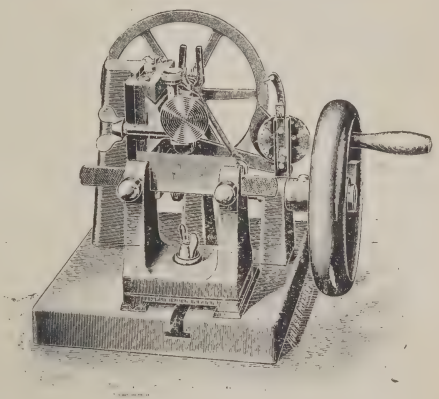

Fig. 135. — Microtome de Minot.

On préparera d'autre part : de l'eau chaude (vers 40°-45°), à répartir dans un couvercle de boîte de Petri ; du papier de soie (le papier à cigarettes est parfait) ; du papier-filtre ; des aiguilles à dissocier.

a. Enduire les lames, bien sèches, d'une couche extrêmement mince d'albumine glycérinée. Le plus simple est d'y déposer une très petite goutte, et d'étaler avec le doigt.

b. Prendre les coupes avec l'aiguille, les déposer à la surface de l'eau chaude. Elles s'étalent, grâce à la chaleur. Avec les aiguilles, séparer les coupes, et au besoin compléter l'étalement.

c. Plonger dans l'eau la moitié inférieure d'une feuille de papier de soie, large de 2 à 3 centimètres ; amener une coupe sur le papier.

d. Très rapidement, enlever le papier de soie, renverser sur une lame (comme pour décalquer), en ayant soin de ne pas laisser se faire de plis. La coupe est entre la lame et le papier.

e. Sécher à l'aide de papier-filtre posé bien à plat et pressé sur le papier de soie. Enlever le papier-filtre, puis le papier de soie. Si la dessiccation est suffisante, la coupe reste adhérente.

f. Porter au-dessus d'une veilleuse, jusqu'à ce que la chaleur soit insupportable au dos de la main (environ 60°). La fixation est faite.

Le temps *f* est un peu délicat. Si on chauffe trop, des bulles se forment et décollent la coupe ; si on ne chauffe pas assez, l'albumine n'est pas coagulée, et la coupe n'adhère pas. C'est une éducation à faire.

On peut porter dans l'étuve à 55° pendant une demi-heure.

Enlèvement de la paraffine. — Laver, doucement, au xylol, qui dissout la paraffine ; la coupe devient transparente. Égoutter.

Laver à l'alcool absolu. La coupe devient opaque.

Plonger dans un petit cristallisoir ou un verre plein d'eau.

On peut commencer alors la coloration.

Coloration.

Dans la coloration d'une coupe bactériologique, on cherche surtout à *voir les microbes* ; il faut donc les différencier du tissu où ils se trouvent. Il est souvent indiqué de colorer également le tissu de telle manière qu'on puisse tout au moins apprécier les rapports topographiques des microbes avec les éléments anatomiques.

Il existe des méthodes générales et des méthodes spéciales.

Remarques. — I. Verser les colorants ou réactifs à côté de la coupe (et non directement sur elle) ; faire glisser sur la coupe en inclinant la lame.

II. Ou bien, porter la lame dans un bain de colorant ou de réactif.

III. Pour les lavages à l'eau : disposer un petit récipient (verre, cristallisoir) plein d'eau ; y plonger les coupes.

IV. Une coupe colorée peut être examinée entre lame et lamelle, en intercalant une goutte d'eau. Il vaut mieux monter au baume du Canada.

V. *Montage au baume.* — Avant de monter dans le baume du Canada, il faut d'abord déshydrater, puis enlever l'alcool absolu par le xylol. — Le xylol *éclaircit* les coupes. On peut éclaircir davantage, en faisant agir l'essence de girofle avant le xylol, mais l'essence décolore.

Pour monter, employer le baume du Canada dissous dans le xylol, de consistance sirupeuse. — Déposer une goutte de baume au bord de la préparation ; saisir par la tranche une lamelle bien propre, la chauffer légèrement pour enlever toute trace d'eau ; poser la lamelle sur le côté libre du baume, laisser tomber par son propre poids ; appuyer légèrement pour étaler le baume.

Méthodes générales. — Nous étudierons la coloration simple et la méthode de Gram.

Coloration simple. — Elle est applicable à tous les microbes qui se décolorent facilement par les couleurs d'aniline.

A. Procédé au tanin (M. Nicolle). — *a.* Colorer pendant quelques minutes au bleu phéniqué.

b. Laver à l'eau. Faire agir pendant quelques secondes une solution aqueuse de tanin à 10 p. 100. Le tanin rend à peu près insoluble le colorant fixé par les microbes ou les tissus.

c. Laver à l'eau. Déshydrater par l'alcool absolu.

d. Passer au xylol, monter.

B. Procédé a la thionine (M. Nicolle). — *Procédé de choix.*

a. Colorer pendant une à deux minutes à la thionine phéniquée.

b. Laver à l'eau. Déshydrater par l'alcool absolu.

c. Passer au xylol, monter.

Ce procédé est excellent. Il faut s'y habituer. On surveillera particulièrement le temps *b* ; l'alcool enlève une partie du colorant. S'il agit trop longtemps, tout peut être décoloré, y compris les microbes ; s'il agit trop peu, le tissu demeure trop coloré, les microbes sont peu visibles. Il est facile de trouver le juste milieu.

Double coloration. — On peut obtenir sans peine une double coloration avec les méthodes précédentes. Pour le procédé à la thionine, on procédera comme suit :

a. Colorer à la thionine phéniquée.

b. Décolorer légèrement par l'alcool, laver à l'eau.

c. Traiter rapidement par l'éosine à 1 p. 1 000 ; laver à l'eau.

d. Déshydrater à l'alcool absolu. — Pour ne pas trop décolorer, éponger d'abord au papier de soie ; déshydrater ensuite.

e. Passer au xylol, monter.

Coloration par la méthode de Gram. — Les microbes prenant le Gram se prêtent facilement aux doubles ou triples colorations.

Double coloration. — *Procédé de choix.* — *a*. Colorer au violet de gentiane phéniqué, vingt à quarante secondes (suivant l'épaisseur).

b. Traiter par le liquide de Gram, cinq à dix secondes, renouveler deux ou trois fois.

c. Décolorer à l'alcool-acétone. Laver à l'eau.

d. Colorer à l'éosine au millième, quinze à trente secondes (teinte rose). Laver à l'eau.

e. Déshydrater à l'alcool absolu.

f. Passer au xylol, monter.

Les microbes, colorés en violet foncé, tranchent sur le fond rouge du tissu. Mais la teinte du fond est uniforme, sans différenciation ; la triple coloration permet de mieux étudier le tissu.

Triple coloration. — *Procédé de M. Nicolle.* — Traiter pendant quinze minutes par le carmin de Orth alcoolisé :

Carbonate de lithine, à saturation dans l'eau.....	40 centimètres cubes.
Carmin n° 40.....	1 gramme.

Triturer au mortier. Filtrer.
Ajouter un sixième d'alcool absolu.

Laver à l'eau.

b. Colorer au violet de gentiane phéniqué.

c. Traiter par le liquide de Gram.

d. Décolorer par l'alcool-acétone (p. 241).

e. Faire agir l'alcool picriqué quelques secondes :

Alcool absolu.....	150 centimètres cubes.
Acide picrique.....	1 gramme.

f. Déshydrater à l'alcool absolu.

g. Passer au xylol, monter.

Les microbes sont teintés en violet; les noyaux, en rose ; le protoplasma, en jaune.

Méthode de Claudius. — On peut employer la méthode de Claudius : faire agir le colorant et la solution picriquée (Voy. p. 241) pendant deux minutes ; décolorer à l'essence de girofle, goutte à goutte, jusqu'à ce que la préparation prenne une teinte jaunâtre. Pour double et triple coloration, on opérera comme il a été indiqué pour la méthode de Gram.

Méthodes spéciales. — D'autres méthodes, applicables seulement à quelques espèces, seront décrites dans la bactériologie spéciale (Voy. en particulier *Tuberculose*, *Syphilis*).

CHAPITRE XVII

STAPHYLOCOQUE

Cultivé d'abord par Pasteur en 1880 (pus de furoncle, eau de Seine), le Staphylocoque a été étudié ensuite par Ogston, par Rosen-

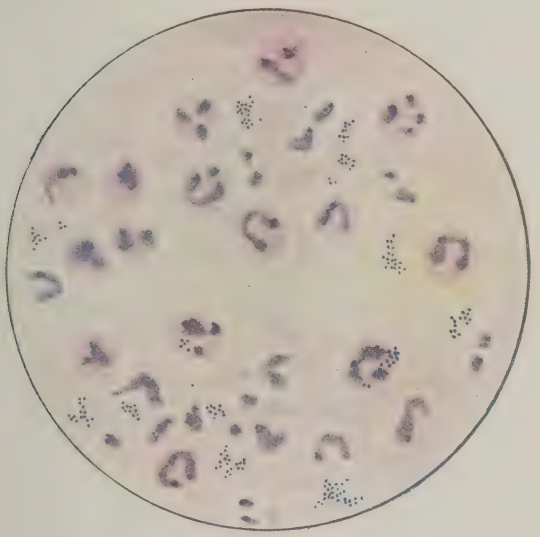

Fig. 136. — Pus à Staphylocoque (coloration par le Gram).

bach et nombre d'auteurs. D'ordinaire saprophyte, il est fréquemment pathogène et constitue l'agent habituel des suppurations aiguës.

On a voulu démembrer les Staphylocoques en trois espèces, d'après leur pouvoir chromogène : *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Staph. pyog. citreus* et *Staph. pyog. albus*. Il est aujourd'hui admis que l'espèce est une (Rodet et J. Courmont, Netter), le pouvoir chromogène ne constituant pas un caractère fixe; il existe un *Staph. pyog. aureus*, avec les variétés *citreus* et *albus*.

Nous prendrons comme type le Staphylocoque doré ou *St. aureus*, en notant au passage les particularités concernant les autres variétés.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — L'élément fondamental est un coccus, mesurant en moyenne 1 μ.

Dans les produits pathologiques (pus), les éléments se groupent en courtes chaînettes de trois à quatre éléments, en diplocoques, en petits amas, rarement en amas volumineux (fig. 136). Dans certaines circonstances, le Staphylocoque peut revêtir une forme plus complexe, spécialement dans les grains de botryomycose (Voy. art. *Botryomycose*, à la fin de ce chapitre).

Dans les cultures (fig. 137), la forme en grappes prédomine, d'où le

Fig. 137. — Staphylocoque; culture en strie sur gélatine, quarante-huit heures.

nom de l'espèce: la plupart des éléments sont tassés les uns contre les autres en amas irréguliers, renfermant 10 à 40 éléments et souvent plus, parfois un peu aplatis par le tassement. — A côté des grappes, on trouve toujours des éléments isolés ou réunis en petit nombre sous des formes variées, diplocoques, courtes chaînettes, tétrades, etc.

Mobilité. — Immobile.

Coloration. — Le Staphylocoque se colore facilement par les couleurs d'aniline. Il *prend le Gram.*

Cils. — Non cilié.

Spores. — Ne donne pas de spores.

CULTURES.

Conditions générales. — Le développement a lieu entre + 10° et + 44°. Température optima : 30° à 37°.

Aérobie facultatif, le Staphylocoque cultive aussi bien en l'absence qu'en présence de l'air.

Il se développe facilement sur les milieux ordinaires.

A. *Staphylococcus pyogenes aureus*. — **Gélatine**. — Culture caractéristique. *La gélatine est liquéfiée.*

1° Colonies isolées sur plaques. — Vers 18° à 20°, au deuxième ou troisième jour, colonies arrondies, grisâtres, à centre jaune ; bords réguliers. Au quatrième ou cinquième jour, la colonie primitive s'est entourée d'un cercle de gélatine liquéfiée, trouble, renfermant des flocons jaunes. La liquéfaction progresse dans la suite. Assez souvent les cultures dégagent une odeur aigrelette.

2° En piqures (fig. 138). — En vingt-quatre heures, culture d'aspect granuleux, jaunâtre. La liquéfaction débute du deuxième au troisième jour. Vers le sixième jour, aspect typique : sac de liquéfaction tronconique, avec dépôt jaune-orange au fond, liquide trouble au-dessus ; en surface, la liquéfaction atteint le bord du tube. Dans la suite, la liquéfaction progresse lentement; elle atteint rarement le fond du tube.

La rapidité avec laquelle se produit la liquéfaction est assez variable. Elle peut être retardée au quinzième ou vingtième jour.

3° En strie. — En deux à trois jours, bande luisante, jaune d'or, large de 3 à 5 millimètres. Plus tard, le milieu se liquéfie.

Gélose (fig. 139). — En strie, enduit peu épais, d'apparence grasse. La coloration jaune est souvent nette en deux jours, parfois plus tard.

Sérum coagulé. — Comme sur gélose.

Pomme de terre. — Couche épaisse, jaune, en deux à trois jours. La coloration jaune est généralement plus intense sur pomme de terre que sur les autres milieux.

Bouillon. — En vingt-quatre heures, trouble uniforme ; les jours suivants, il se produit au fond un dépôt qui, d'abord blanc, devient jaunâtre dans la suite. Le liquide demeure trouble. La teinte jaune

est d'ordinaire moins nette en bouillon que sur les milieux solides.

Lait. — Coagulé.

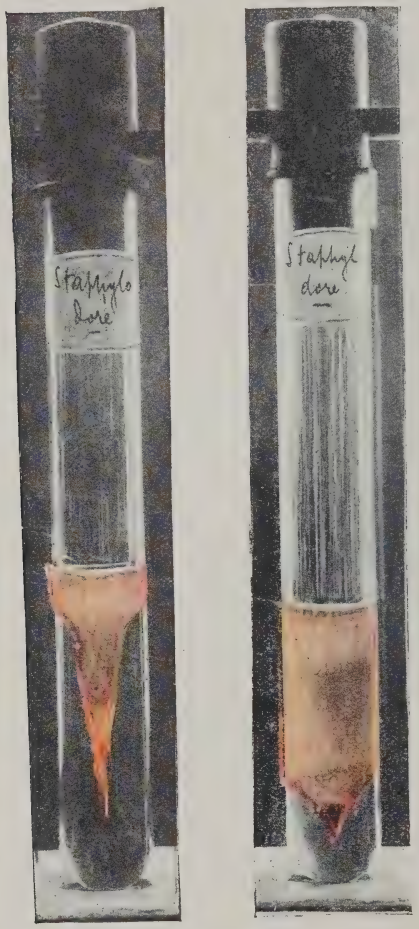

Fig. 138. — Cultures de Staphylocoque en piqûre sur gélatine : au cinquième jour (à gauche) et au douzième jour (à droite).

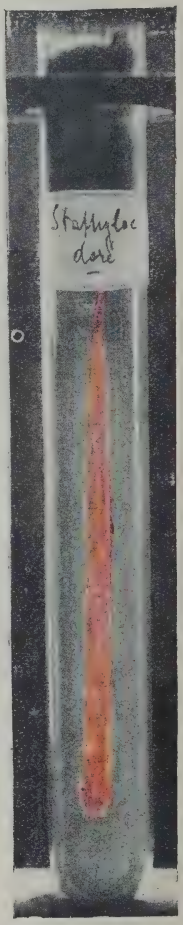

Fig. 139. — Staphylocoque (culture sur gélose).

B. *Staphylococcus pyogenes citreus*. — Les différentes cultures sont jaune clair (citron) ; tous les autres caractères sont les mêmes que ci-dessus.

C. *Staphylococcus pyogenes albus.* — Cette variété ne produit pas de pigment. Les cultures sur milieux solides sont d'un blanc franc, souvent porcelaine. La liquéfaction de la gélatine est parfois très tardive et peut même faire défaut.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le Staphylocoque présente une grande vitalité. Il reste vivant plusieurs mois, parfois même un an, sur milieux liquides, plus longtemps encore sur milieux solides.

En cultures, il faut, pour le tuer, un chauffage d'une heure à 72° (Rodet), de cinq minutes à 80° (Sternberg). Mais, dans les produits pathologiques, il peut supporter 100°.

L'action des antiseptiques est importante à connaître (désinfection chirurgicale). Le Staphylocoque est tué par le sublimé à 1 p. 1 000 en quinze minutes (Viquerat); par l'aldéhyde formique à 2 p. 1 000 en quinze minutes (Pottevin); par l'eau oxygénée à 1 p. 100 en quelques minutes; par l'alcool à 60° en une minute.

Réactions biochimiques. — Le Staphylocoque fait fermenter la lactose, la glucose, en donnant des acides (acide lactique; proportion variable d'acide isobutyrique, valérianique et propionique).

Il provoque la peptonisation du blanc d'œuf.

L'action biochimique la plus intéressante est le pouvoir chromogène.

Pouvoir chromogene. — Le Staphylocoque sécrète un pigment jaune. La matière colorante se produit facilement dans les cultures bien aérées. Elle n'apparaît pas dans les cultures faites dans le vide ou sous l'huile; pas davantage dans les cultures additionnées d'antipyrine. Elle est en général moins abondante dans les cultures entretenues depuis longtemps sur milieux artificiels.

On peut transformer un Staphylocoque doré en Staphylocoque blanc (Rodet et J. Courmont) et inversement (Netter).

Réactions vis-à-vis des sérums. — Agglutination. — I. Expérimentalement, le sérum d'animaux inoculés avec un Staphylocoque pyogène agglutine les Staphylocoques pyogènes, non les saprophytes (Kolle et Otto, Protscher).

Cultivé dans le sérum d'animaux immunisés, le Staphylocoque pousse en gros placards de microbes agglutinés (Bezançon).

II. Chez l'homme, l'agglutination du Staphylocoque pathogène ne semble pas avoir été beaucoup étudiée. Au cours des infections staphylococciques, le sérum peut être agglutinant (Silvestrini,

Mantegazza), mais le fait est inconstant (Courmont). Le sérum normal peut agglutiner à 1 p. 100 (Beitzke).

Sensibilisatrice. — Il existe une sensibilisatrice spécifique dans le sérum des animaux inoculés (Altmann et Blühdorn).

POUVOIR PATHOGÈNE.

Dans les conditions naturelles. — Le Staphylocoque peut être pathogène pour l'homme et pour l'animal.

L'action pathogène est surtout dévolue au *Staph. aureus*, plus rarement au *citreus*, exceptionnellement à l'*albus*.

Chez l'homme. — Les manifestations pathologiques du Staphylocoque sont multiples.

Il est, avant tout, l'agent des suppurations aiguës. Dans les abcès chauds, il intervient seul dans 71 p. 100 des cas; associé au Streptocoque dans 5,5 p. 100 (Janowski).

Parmi les suppurations habituellement provoquées par le Staphylocoque, il faut citer le furoncle (Pasteur), l'anthrax, les abcès cutanés et sous-cutanés, l'ostéomyélite (Lannelongue et Achard).

Sa participation est en outre importante, sans être prépondérante, dans la genèse des arthrites suppurées, des endocardites, des myocardites, des péricardites suppurées, des pleurésies purulentes, des bronchopneumonies infantiles, des péritonites purulentes, des abcès du foie, des otites suppurées, des méningites suppurées (rarement), des infections des voies urinaires (cystite, etc.), des infections génitales de la femme.

Il peut intervenir à titre d'agent secondaire, au cours d'autres affections : diphtérie, angines, suppurations diverses, etc.

Enfin il est capable de déterminer des septicémies ou la pyohémie.

Le rôle du Staphylocoque en pathologie est important, mais on lui a peut-être prêté un peu trop. Certaines affections qui lui étaient rapportées naguère, comme le clou de Biskra, l'impétigo, sont aujourd'hui distraites de son domaine. Il faut beaucoup de circonspection avant d'affirmer l'action pathogène du Staphylocoque (Voy. p. 266).

Chez l'animal. — Le rôle du Staphylocoque paraît moindre jusqu'ici. Il peut produire des abcès chez la plupart des espèces.

Son action la plus intéressante est la production de l'ostéomyélite des jeunes oies (Lucet); il serait également pathogène pour les poissons (goujons), d'après Charrin; pour le lièvre (pyohémie contagieuse, Bürgi).

Inoculation expérimentale. — *Virulence.* — La virulence pu Staphylocoque est très variable.

En règle générale, on peut dire que les Staphylocoques saprophytes sont peu ou pas virulents ; au contraire, les Staphylocoques provenant de produits pathologiques sont plus ou moins virulents dans les conditions expérimentales. Mais il y a des exceptions.

La virulence baisse d'habitude dans les cultures un peu anciennes.

On la remonte en pratiquant des passages par le lapin (veine ou péritoine ; ensemencer le sang du cœur).

D'après Otto Bujwid, Nicolas, la présence du sucre exalte la virulence du Staphylocoque (explication possible de la prédisposition des diabétiques aux suppurations).

L'animal de choix est le lapin, espèce la plus sensible.

Lapin. — L'épreuve type, celle qui doit servir de comparaison, est l'inoculation intraveineuse.

Inoculation intraveineuse. — On inocule I ou II gouttes de culture (J. Courmont) ; les effets sont différents suivant le degré de virulence et l'âge de l'animal.

I. *Virulence très grande* (ou dose forte de virus actif). Mort en moins de deux jours. *Septicémie* pure, sans localisation apparente ; congestion viscérale ; Staphylocoques nombreux dans le sang et les organes.

II. *Virulence moyenne.* — Il convient de voir séparément l'action sur lapin *adulte* et sur lapin *jeune*.

a. *Lapin adulte.* — Mort en huit jours environ, avec fièvre, signes de néphrite aiguë, etc.

La lésion la plus apparente est la *pyohémie : abcès du rein*, parfois groupés en bouquets, et consécutifs à des infarctus suppurés, *constants*. Abcès du myocarde, pointe surtout ; abcès des poumons et du foie. Staphylocoque dans le sang et les organes, spécialement dans les vaisseaux médullaires de la zone du rein (Rodet et J. Courmont).

b. *Lapin jeune* (*deux mois*). — Mort en huit jours environ. Arthrites purulentes perceptibles pendant la vie.

A l'autopsie, outre la pyohémie du lapin adulte (Voy. ci-dessus), on trouve des lésions d'*ostéomyélite* (Rodet, Jaboulay et Courmont ; Lannelongue et Achard) : ostéite, avec pus et séquestres, prédominant dans les os longs, fémur, tibia, au niveau de la diaphyse et de la région juxta-épiphysaire ; périostite (petits abcès sous-périostés) prédominant aux mêmes régions ; décollement juxta-épiphysaire, par fracture de l'épiphyse contiguë. Cartilage de conjugaison ordinairement indemne ; *arthrite purulente* (genoux) le plus souvent provoquée par un abcès voisin. Les microbes sont très nombreux dans la moelle et le tissu osseux.

Le Staphylocoque peut se spécialiser. Un microbe de Bezançon et Labbé, provenant d'une arthrite suppurée humaine, provoquait toujours des arthrites suppurées chez l'animal.

Virulence faible (ou dose faible de virus fort). — Lapin adulte.

Mort au delà de vingt jours, avec arthrites suppurées.

Parfois, plus tardivement, symptômes et lésions de myélite (J. Courmont, Gilbert et Lion).

Inoculation sous-cutanée. — Habituellement, il se produit un abcès, qui guérit spontanément. Exceptionnellement, mort par septicémie, avec ou sans lésions (nécrose) des viscères.

Inoculation intrapéritonéale. — Relativement peu sensible. Des doses très fortes provoquent une péritonite fibrino-purulente, mortelle, avec septicémie.

Inoculation intrapleurale. — Un peu plus sévère. Pleurésie purulente mortelle avec septicémie.

Inoculation dans la chambre antérieure de l'œil. — Suppuration. Voie très sensible.

Autres animaux. — Chez le *cobaye*, on provoque un abcès par inoculation sous-cutanée ; une péritonite par inoculation intrapéritonéale.

Il est pathogène également pour le *rat*, le *chien*.

Chez l'*oie*, Lucet a reproduit l'ostéomyélite par injection intraveineuse.

Chez le *chimpanzé*, l'inoculation (scarification) du Staphylocoque du pemphigus humain réalise le pemphigus expérimental.

TOXINES.

I. Dans les filtrats de cultures, l'alcool précipite une substance qui, inoculée dans la chambre antérieure de l'œil, se montre pyogène (Christmas).

Inversement, Leber aurait préparé une autre substance (*phlogosine*), celle-ci soluble dans l'alcool, également pyogène.

II. D'après Rodet et J. Courmont, les filtrats sont peu toxiques (rétention par le filtre).

Ils renferment deux séries de substances que les auteurs considèrent comme antagonistes les unes des autres :

Les unes, précipitables par l'alcool, déterminent surtout des troubles respiratoires et moteurs (convulsions, tétanos) ;

Les autres, solubles dans l'alcool, provoquent de l'anesthésie et des troubles cardiaques.

III. Entre les mains de Mosny et Marcano, le filtrat s'est montré

toxique pour le lapin : mort rapide (quelques secondes) à dose de 10 centimètres cubes dans les veines. A dose faible (1 à 2 centimètres cubes), l'animal devient cachectique et meurt après cinq à six semaines.

Les filtrats de cultures cinq jours en bouillon Martin glucosé sont toxiques (M. Nicolle et Césari). La dose limite mortelle pour le lapin, par voie intraveineuse, est de 0,5 centimètre cube. Inoculé sous la peau du cobaye, ce filtrat produit une escarre humide.

IV. *Toxines vaccinantes et toxines prédisposantes.* — Les produits précipitables par l'alcool (Voy. ci-dessus) sont vaccinants (Rodet et Courmont). — Les produits solubles dans l'alcool (Rodet et Courmont), de même que le filtrat brut (Mosny et Marcano), se montrent au contraire prédisposants.

V. *Leucocidine.* — L'exsudat obtenu par inoculation intrapleurale renferme beaucoup de globules blancs avariés. Il a la propriété d'altérer les leucocytes normaux, d'où son nom (Van de Velde).

VI. *Hémolysine* (*staphylolysine*). — Les cultures en bouillon de neuf à treize jours, filtrées ou non, renferment une hémolysine active sur les globules rouges du lapin, du mouton, du cobaye (Neisser et Wechsberg), beaucoup moins active sur les globules de l'homme.

Il faut donner initialement au bouillon la réaction voulue ; on ajoutera les deux tiers de la quantité d'alcali nécessaire pour le rendre alcalin à la phtaléine du phénol.

L'hémolysine apparaît vers le quatrième jour, atteint son maximum vers le dixième ou onzième et décroît ensuite. Elle ne se conserve bien qu'à la glacière. Elle est détruite par un chauffage de vingt minutes à 56° ; mais un chauffage ultérieur à 100° la ferait en partie réapparaître.

La production d'hémolysine serait strictement spéciale aux Staphylocoques pyogènes, à l'exclusion des saprophytes : fait contesté.

Injectée aux animaux, elle fait apparaître dans le sérum des propriétés antihémolytiques. Une antihémolysine existe d'ailleurs normalement dans le sérum humain. La puissance antihémolytique du sérum augmente beaucoup au cours des infections à Staphylocoques (Bruck, etc.) ; on a même proposé le dosage de l'antihémolysine comme moyen de diagnostic des infections staphylococciques.

SIÈGE.

Dans l'organisme humain. — A l'état normal, le Staphylocoque se rencontre d'une manière constante sur la peau (surtout *St. albus*), et fréquemment sur la plupart des muqueuses externes : bouche, urètre, vagin.

A l'état pathologique, il existe dans les divers processus signalés plus haut (Voy. p. 262) ; en cas de septicémie, dans le sang.

Dans les milieux extérieurs. — Abondamment répandu dans l'eau, les poussières, dans l'air, etc.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic de l'infection staphylococcique est basé exclusivement sur la constatation et l'identification du microbe.

Recherche du microbe. — Produits pathologiques. — Les prélèvements étant opérés comme il est indiqué ailleurs (chap. XIII), on procédera tout d'abord à l'*examen direct*. Préparer des frottis, faire deux colorations.

1° Coloration simple;

2° Coloration par la méthode de Gram.

Le Staphylocoque présente les caractères indiqués ci-dessus.

On pratiquera ensuite l'*isolement* du microbe par culture sur milieux solides: dissocier une goutte de produit pathologique dans le liquide d'exsudation d'un tube de gélose; incliner le tube pour répartir à la surface; prélever une anse de ce liquide, porter sur un deuxième tube, opérer comme pour le premier; prélever une anse du deuxième tube, ensemencer un troisième.

Après culture, on repiquera les colonies parfaitement isolées et on vérifiera les caractères du Staphylocoque pyogène: cultures surtout, morphologie.

Si la provenance du microbe reste douteuse (Voy. ci-dessous, *Observation*), procéder à l'inoculation intraveineuse du lapin.

Sang. — On pratiquera l'hémoculture (Voy. chap. *Analyses bactériologiques appliquées à la clinique*).

Observation. — Le Staphylocoque, hôte normal des téguments, peut être ensemencé accidentellement, si le prélèvement est fait à travers la peau (sang, sérosités, etc.). D'autre part, il se surajoute facilement aux autres espèces pathogènes plus nocives: au Bacille tuberculeux (particulièrement dans les pleurésies purulentes), au Streptocoque (surtout dans les collections ouvertes), etc. Enfin il est un agent possible d'infections cadavériques. D'où de multiples causes d'erreur.

Trouve-t-on le Staphylocoque dans des circonstances non habituelles (en dehors de l'ostéomyélite, du furoncle, etc.), *il faut soumettre l'épreuve à un contrôle très sévère.*

Pour les produits pathologiques: constater la présence du microbe *par l'examen direct; s'assurer par les épreuves nécessaires qu'il n'y a pas d'autres microbes* (Bacille de Koch surtout).

Pour le sang: répéter l'hémoculture à plusieurs reprises. Se méfier surtout du *St. albus*; accorder plus de crédit aux *St. aureus* et *citreus* (les débutants en hémoculture obtiennent fréquemment le *St. blanc*).

VACCINATION ET SÉROTHÉRAPIE.

I. L'animal traité par les substances vaccinantes (Voy. p. 265) est relativement immunisé (J. Courmont).

II. Quelques auteurs auraient réussi à produire un sérum de faible activité : Capman, par inoculations de filtrats (chien, lapin) ; Parascandolo, par injection de cultures virulentes en bouillon sucré ; Proscher, en inoculant à la chèvre des cultures vivantes.

Ces divers sérums peuvent protéger l'animal contre une ou quelques doses mortelles, mais ne sont guère sortis jusqu'ici du domaine du laboratoire.

Vaccinothérapie. — Les injections staphylococciques constituent pour le moment l'objectif le plus accessible à la vaccinothérapie (Wright). Elle est particulièrement efficace dans la furonculose à répétition (Mauté).

Technique (Mauté). — Isoler le Staphylocoque du malade à traiter, cultiver sur gélose, émulsionner la culture dans le sérum artificiel, chauffer à 56° pendant une heure deux fois de suite, à vingt-quatre heures d'intervalle ; additionner d'eau physiologique pour amener le nombre de germes à 500 millions par centimètre cube ; répartir en ampoules.

Injecter d'abord 0cc,25, puis (après cinq jours) 0cc,50, puis 1 centimètre cube ; on peut porter dans la suite à 2 et 3 centimètres cubes.

A la rigueur, on peut employer un Staphylocoque étranger.

BOTRYOMYCOSE.

La botryomycose, observée surtout chez le cheval, est constituée par une lésion sous-cutanée, formant tumeur dure et diffuse, d'où s'écoule un pus chargé de grains jaunâtres. Chaque grain est limité par une coque réfringente à contour net, renfermant des amas de microcoques qui prennent le Gram. Les cultures donnent un germe présentant tous les caractères du Staphylocoque doré.

En raison de la structure histologique spéciale des lésions, la nature de la botryomycose demeurait jusqu'ici incertaine ; car on s'expliquait mal comment le Staphylocoque, agent habituel des suppurations banales, pouvait donner des grains. Les recherches récentes de Magrou ont élucidé la question.

Lorsqu'on inocule au cobaye, dans le testicule, des crins de cheval stérilisés, souillés de Botryocoque, il apparaît le long du trajet des lésions qui, à l'examen histologique, présentent des grains botryomycotiques ; comme dans la botryomycose spontanée, on voit des amas microbiens entourés d'une coque réfringente ; mais ici, la

coque réfringente, au lieu d'être homogène comme chez le cheval, est formée d'une palissade de massues, identiques par leur forme, leur disposition et leurs réactions tinctoriales, aux massues des grains jaunes d'actinomycose. Mêmes résultats avec divers échantillons de Staphylocoques ne provenant pas de la botryomycose.

D'autres expériences ont montré que les effets locaux du Staphylocoque dépendent de la dose inoculée. De fortes doses déterminent la nécrose des globules blancs exsudés. Après inoculation de doses infinitésimales, apparaissent des foyers leucocytaires, parfois des cellules géantes, sans germes visibles. Avec des doses moyennes, leucocytes et bactéries équilibrent leurs forces et se tolèrent réciproquement: les nodules leucocytaires entourent les bactéries et leur résistent, mais sans arriver à les détruire.

Aux constatations de Magrou, il faut en outre ajouter que, d'après Nicolle et Césari, le sérum de chevaux atteints de botryomycose est capable de neutraliser la toxine staphylococcique.

De ces diverses recherches on peut conclure que la botryomycose est bien une infection à Staphylocoques, évoluant sous une forme spéciale.

CHAPITRE XVIII

STREPTOCOQUE

Le Streptocoque a été nettement décrit par Pasteur et Doléris (1880) chez des malades atteintes d'infection puerpérale. Agent pathogène spécifique de l'érysipèle (Fehleisen), agent habituel de l'infection puerpérale (Widal) et des suppurations chirurgicales (Ogston, Passet), il cause en outre nombre d'affections, sous les formes anatomiques les plus variées, dans les organes et tissus les plus différents, chez l'homme et chez nombre d'espèces animales. « Microbe à tout faire », disait justement Peter. De tous les microbes pathogènes, c'est probablement celui qu'on rencontre le plus souvent dans les infections humaines.

En raison même de l'immensité et de la variété de son rôle pathogène, le Streptocoque est considéré par nombre d'auteurs comme formant non une espèce, mais une famille, composée d'espèces différentes les unes des autres : d'autres savants, au contraire, sont unicistes, tous les Streptocoques appartenant d'après eux à une seule et même espèce. Querelle toujours pendante et dont on ne peut entrevoir la solution. Nous nous contenterons d'esquisser rapidement les arguments apportés de part et d'autre.

Unité ou multiplicité. — I. Certains Streptocoques se séparent du Streptocoque type par une propriété anormale : décoloration au Gram, développement strictement anaérobie, liquéfaction de la gélatine, etc. Suivant l'importance de cette anomalie, il s'agit alors d'espèces distinctes ou de simples variétés, que nous retrouverons plus loin. Il n'y a pas de discussion sur ce point.

II. Les différentes propriétés du Streptocoque peuvent varier dans une assez large mesure. C'est ainsi qu'on a tenté d'édifier des espèces différentes suivant les variations morphologiques (Lingelsheim), l'aspect des cultures en bouillon (Behring), sur pomme de terre (Marot), en lait (Klein), la virulence expérimentale (Lingelsheim), etc. Mais des recherches de contrôle, en particulier celles de Widal et Bezançon, de H. Vincent, ont montré que ces diverses propriétés sont contingentes et peuvent varier, pour un même échantillon, au gré de l'expérimentateur. Il est de même établi que leur provenance ne suffit pas à individualiser les Streptocoques : on ne relève pas de différence entre ceux des phlegmons, de l'érysipèle ou des septicémies.

III. Devant l'absence de toute base de différenciation, Marmorek (1902) édifie le *trépied de l'unicisme*. Les Streptocoques humains constituent une

seule espèce, car : 1° tout Streptocoque est inapte à se développer sur milieux vaccinés contre un Streptocoque quelconque ; 2° tous les Streptocoques sont hémolysants ; 3° le sérum antistreptococcique est actif à l'égard de tous les Streptocoques. Seul, le Streptocoque de la gourme (cheval) fait exception à la première et à la troisième règles, et se trouve érigé en espèce distincte.

Le premier caractère, que Besredka dénomme justement « signe de Marmorek », a été peu étudié depuis. Le second, le pouvoir hémolytique, serait trop banal pour servir de critérium (Besredka) ; quant au troisième, action spécifique des sérums, il a été diversement apprécié, comme nous allons le voir.

IV. L'irrégularité des actions agglutinantes (Voy. plus loin) ne permettant pas de s'adresser à l'agglutination, on s'est orienté de préférence vers l'étude du pouvoir préventif. Suivant Marmorek, Aronson, Neufeld, Marxer, le sérum provenant d'un animal immunisé contre un seul Streptocoque se montre préventif, non seulement à l'égard de ce Streptocoque, mais à l'égard de tous les Streptocoques ; le Streptocoque de la gourme fait exception d'après Marmorek, alors que Marxer le fait rentrer dans la règle générale. Ce dernier détail mis à part, les auteurs précités sont d'accord pour affirmer que tous les Streptocoques, étant également sensibles à l'action d'un sérum monovalent, appartiennent à une même espèce.

V. Mais l'assertion précédente est discutée. Courmont, Méry et Lorain mettent en doute la base même de la conception : des Streptocoques, parfaitement authentiques, sont indifférents à l'action préventive du sérum de Marmorek. Besredka, sans discuter les faits avancés par Marmorek, Aronson, etc., les interprète différemment : pour éprouver un sérum à l'égard d'un Streptocoque, il faut d'abord rendre ce Streptocoque très virulent pour l'espèce choisie, lapin ou souris ; cette exaltation de virulence étant obtenue par passages successifs d'animal à animal, on crée un « Streptocoque de passage », adapté à l'animal d'expérience, et toujours le même, quelle que soit sa qualité originelle. Les essais de contrôle d'Aronson, Neufeld, etc., seraient ainsi toujours opérés sur un seul et même Streptocoque, « Streptocoque de passage » du lapin ou de la souris, et ne sauraient avoir de portée générale.

VI. Besredka suppose qu'il y a tout au moins plusieurs variétés de Streptocoques ; cette nouvelle classification est basée sur l'épreuve de la déviation du complément. D'après cette épreuve, un même sérum peut être actif à l'égard de microbes de provenances très diverses ; inversement, des microbes de provenance semblable peuvent être doués de propriétés fixatrices très dissemblables.

VII. La question est toujours à l'étude. Mais l'opinion est plus favorable aux pluralistes.

Essais de classification des Streptocoques. — Outre les premières bases de différenciation rappelées ci-dessus (V. § II) et depuis longtemps désuètes, on a essayé d'autres moyens de classification. Citons en particulier :

1° L'action sur les sucres, utilisée surtout par les auteurs américains (Gordon ; Holwan ; Andrews et Horder, etc.). Tous les Streptocoques font fermenter la glucose, alors que l'action sur les autres sucres varie suivant les échantillons, et ce sont précisément ces variations qui constituent la base de classification. Cette base elle-même serait peut-être discutable, car la fixité des propriétés fermentatives pour un même échantillon n'est pas

démontrée ; d'après Walker et d'autres auteurs, les propriétés fermentatives seraient susceptibles de se transformer au cours des repiquages. D'autre part, il n'y a pas concordance entre les classifications établies sur la fermentation des sucres d'une part, et d'autre part les classifications obtenues par les réactions sériques, l'action sur le sang, etc.

2° La présence ou l'absence de propriétés hémolytiques, classification proposée par Schottmüller ; parmi les Streptocoques pathogènes pour l'homme, il y aurait deux groupes : le *Streptoc. longus*, hémolytique, et le *Streptoc. mitior seu viridans*, non hémolytique.

3° La combinaison de plusieurs caractères. Citons à titre d'exemple la classification de Blake :

I. *Strept. hemolysans.*

II. *Strept. non hemolysans*

Lactose +	Mannite —	*Str. buccalis.*
Lactose +	Mannite —	*Str. fœcalis.*
Lactose —	Mannite —	*Str. equinus.*

Pour le moment, la valeur de ces diverses classifications est discutable. Elles représentent de simples constatations de faits, sans valeur générale jusqu'à présent. Il importe cependant de souligner que la plupart des Streptocoques franchement pathogènes pour l'homme sont hémolytiques, comme on a pu le vérifier récemment à propos des plaies de guerre (Tissier, Levaditi, etc.), mais cette règle elle-même comporte des exceptions.

Dans cette étude, nous aurons surtout en vue les Streptocoques d'*origine humaine*.

STREPTOCOQUES D'ORIGINE HUMAINE.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — La forme typique du Streptocoque est une chaînette de cocci.

Dans les tissus ou produits pathologiques (fig. 140), les chaînettes sont généralement courtes, quatre à dix éléments ; elles se trouvent mélangées à de simples diplocoques et à des cocci isolés. La taille de chaque coccus est variable, en moyenne 0 μ 5 à 1 μ.

En cultures sur milieux liquides, les chaînettes sont généralement plus nettes, mesurant vingt à cinquante éléments, et davantage, mélangées à des formes plus courtes ; le diamètre de chaque élément est extrêmement variable, plus encore que dans les tissus. Le plus souvent la chaînette est parfaitement régulière (fig. 141, à gauche) ; plus rarement elle paraît constituée par une association de diplocoques (diplo-streptocoque, fig. 141, à droite) ; ou bien les grains sont de volume inégal, disposition particulière

aux cultures vieilles, les éléments les plus gros représentant des formes d'involution. Les cocci sont généralement tout à fait ronds, parfois un peu allongés dans le sens transversal ou dans le sens longitudinal. Exceptionnellement les chaînettes sont bifurquées en Y (Achalme, H. Vincent). Dans certains cas, les cocci sont pelotonnés en amas, d'où s'échappent des chaînettes caractéristiques.

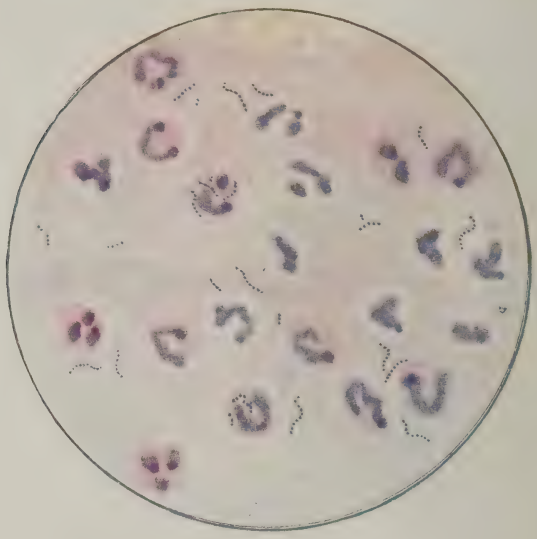

Fig. 140. — Pus à Streptocoque (coloration par le Gram).

Sur milieux solides, on retrouve les mêmes aspects, mais les chaînettes sont généralement moins longues.

On avait un moment tenté de distinguer les Streptocoques d'après leur morphologie: *St. longus* ou *St. brevis* (Lingelsheim), suivant la longueur des chaînettes; *St. conglomeratus*, en amas, dont Kurth voulait faire l'agent de la scarlatine; *St. tenuis* (Veillon), à grains très petits (fig. 142). Il est démontré que ces variations n'ont rien de spécifique et peuvent être reproduites avec un même échantillon (Widal et Bezançon).

Coloration. — Le Streptocoque se colore bien par les couleurs d'aniline. *Il prend le Gram.*

On a parfois rencontré chez l'homme (Étienne, Lemoine) des Streptocoques décolorés par le Gram; ce sont des faits exception-

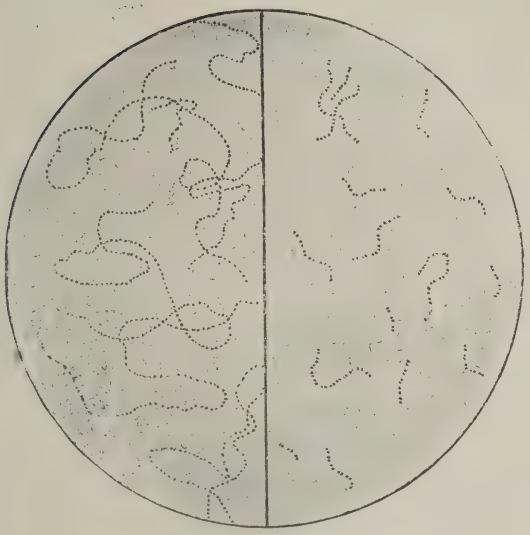

Fig. 141. — Streptocoques,

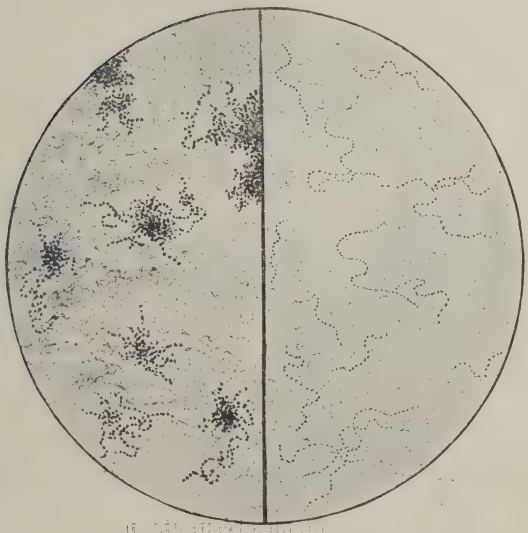

Fig. 142. — Streptocoques.
Conglomeratus. | *Tenuis.*

nels. On se rappellera que la réaction de Gram doit toujours être faite sur des cultures jeunes. Le Streptocoque de la mammite de la vache, qui ne prend pas le Gram, constitue une espèce à part (Voy. p. 285).

Mobilité. — **Spores**. — Immobile ; ne donne pas de spores.

CULTURES.

Conditions générales. — Le Streptocoque se développe aussi bien en présence ou à l'abri de l'air. La température optima est 37°. Il n'y a plus de développement appréciable au delà de 46° ou au-dessous de 20°. Les milieux neutres ou un peu alcalins sont préférables ; l'addition de sang ou de sérum favorise la culture.

Bouillon. — L'aspect des cultures est variable. En vingt-quatre heures :

a. Le plus souvent, le liquide reste clair ; des flocons se concrètent sur les parois et, dès le deuxième ou troisième jour, tombent en partie au fond, formant dépôt ; en agitant, les flocons se disséminent dans le liquide, sans le troubler, puis retombent.

Les chaînettes, longues ou pelotonnées, sont alors prédominantes.

b. D'autres fois, le milieu se trouble à peu près uniformément ; plus tard le liquide s'éclaircit et il se forme un dépôt. On trouve surtout des chaînettes courtes.

c. Ces différences d'aspect ne sont pas caractéristiques de tel ou tel Streptocoque : elles se reproduisent pour un même échantillon, au hasard des circonstances. H. Vincent a montré qu'en général les cultures sont troubles en milieu neutre, claires en milieu légèrement acide.

d. Quel que soit son aspect, le bouillon devient rapidement acide.

Bouillon-sérum. — Marmorek a montré que le bouillon-sérum convient particulièrement pour assurer la vitalité et conserver la virulence du Streptocoque. Il recommande spécialement les milieux suivants, rangés par ordre de préférence :

Bouillon ordinaire...	1 partie..	Sérum humain..	2 parties.
—	2 parties.	Sérosité d'ascite.	1 partie.
—	1 partie..	Sérum de cheval.	2 parties.

L'aspect des cultures est le même que dans le bouillon ordinaire ; mais le développement, plus précoce, peut être constaté après cinq à six heures.

Besredka utilise, avec les mêmes résultats, un mélange à parties égales de bouillon Martin et de sérum de cheval chauffé.

Bouillon au blanc d'œuf alcalin. — Mêmes caractères de culture qu'en bouillon-sérum.

Bouillon-sang. — En bouillon additionné de 5 à 10 p. 100 de sang, les Streptocoques hémolytiques déterminent en douze à vingt-quatre heures l'hématolyse; le milieu prend une teinte carminée. — Au contraire, les Streptocoques non hémolytiques ne provoquent pas d'hématolyse; le bouillon reste incolore.

Sérum liquide de lapin. — Culture assez abondante.

Lait. — La plupart des Streptocoques coagulent le lait en deux à cinq jours, en acidifiant fortement; mais quelques échantillons ne coagulent pas.

Gélatine. — A 20°-22°, en quarante-huit heures, la culture *en strie* est mince, blanchâtre, un peu translucide. *En piqûre*, il apparaît le long du trait d'ensemencement des colonies petites, arrondies, blanc opaque. Pas de liquéfaction.

On a parfois rencontré des cocci en chaînettes liquéfiant la gélatine; ce caractère suffit à les éliminer de l'espèce Streptocoque. Citons le *St. coli gracilis* et le *St. coli brevis*, rencontrés dans l'intestin par Escherich, et le *St. nasalis* de Hack et Strauch.

Achalme a montré que la gélatine maintenue à 37°, et par conséquent liquide, constitue un bon milieu de culture.

Sang gélosé. — Ensemencement sur un mélange bien homogène de gélose, 20 parties et sang humain, 1 partie.

Les Streptocoques hémolytiques donnent des colonies blanc grisâtre, entourées d'un large halo transparent, par hémolyse. Les Streptocoques non hémolytiques forment des colonies verdâtres, parfois brunâtres, entourées ou non d'un anneau de teinte verte (Schottmüller). Voy. ci-dessus, *Essais de classification*, 2°.

Gélose (fig. 143). — En surface, la culture est bien développée en vingt-quatre à quarante-huit heures. Les colonies isolées sont blanchâtres, à peine transparentes, rondes ou ovalaires; leur aspect rappelle des grains de semoule. Le centre est généralement plus opaque. Les bords sont ordinairement crénelés (examen à la loupe). Les dimensions sont toujours réduites, 1 à 2 millimètres en moyenne, d'autant plus réduites que les colonies sont plus rapprochées.

Quand les colonies sont confluentes, il se forme une nappe continue à bords déchiquetés.

Cultures de mêmes caractères, mais plus abondantes, sur *gélose-sérum* et sur *gélose au blanc d'œuf alcalin*.

Sérum coagulé. — Mêmes caractères que sur gélose.

Pomme de terre. — La plupart des Streptocoques ne donnent pas de culture apparente, mais il y a néanmoins un certain déve-

loppement, comme on peut s'en assurer en raclant et examinant la surface du milieu. De très rares échantillons produisent des colonies visibles, rondes, transparentes, puis blanchâtres (Marot).

Fig. 143. — Streptocoque sur gélose.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — La vitalité du Streptocoque est fonction des conditions qui lui sont offertes. Cultivé sur bouillon ordinaire, il meurt très vite, en quelques jours, dès que le milieu devient acide (Achalme) ; on peut le maintenir vivant un peu plus longtemps en additionnant le bouillon de carbonate de chaux (His) ; mais il vaut beaucoup mieux s'adresser aux milieux de Marmorek ou de Besredka (Voy. ci-dessus), ou au sang gélosé ; sur ces divers milieux, la vitalité est beaucoup plus grande (plusieurs mois).

En pipette close, ou dans le sang humain défibriné, le Streptocoque peut demeurer vivant pendant un an.

Le Streptocoque résiste peu à la chaleur : un chauffage d'une heure à 58°, ou de quelques secondes à 100°, le tue sûrement dans les cultures ; incorporé au pus, il résiste un peu plus.

Il est très sensible aux antiseptiques usuels.

Réactions bio-chimiques. — Le Streptocoque n'est pas dissous par la bile, contrairement au Pneumocoque.

Ensemencé en milieu T (Voy. *Pneumocoque*) additionné de 1 p. 10 de bile de bœuf précipitée au préalable par chauffage à 120° et filtrée, le Streptocoque ne se développe pas, contrairement à l'entérocoque (Weissenbach).

L'action sur les sucres a été largement étudiée. Tous les Streptocoques fermentent (acidifient) le glucose. Par contre, il est très peu d'échantillons de Streptocoque qui fassent fermenter l'inuline, que le Pneumocoque au contraire attaquerait toujours (His).

Les autres sucres peuvent être ou non attaqués, et les réactions à cet égard ont beaucoup servi, comme nous l'avons vu plus haut, pour édifier des tentatives de classification.

Réactions à l'égard des sérums spécifiques. — En dehors des propriétés préventives et curatives que nous retrouverons en étudiant la sérothérapie, on a surtout étudié l'agglutination.

Agglutination. — Streptocoques de la scarlatine. — Il est actuellement démontré que l'agglutination du Streptocoque par les sérums n'a aucun intérêt; il arrive souvent qu'un sérum agglutine seulement le ou les Streptocoques utilisés dans sa préparation, sans manifester aucune action sur les autres.

A la suite de Moser, on avait pu espérer un moment séparer de par l'agglutination le Streptocoque de la scarlatine ; mais les recherches ultérieures de Baginsky et Sommerfeld, Dopter, etc., ont montré que le sérum des scarlatineux ne présente aucune propriété spécifique constante à l'égard de tel ou tel Streptocoque.

D'après les recherches de Kligler, Blake, etc., les épreuves d'agglutination confirment en partie la classification en Streptocoques hémolytiques et Streptocoques non hémolytiques. Un sérum actif contre un Streptocoque hémolytique agglutine un certain nombre de Streptocoques hémolytiques, sans agglutiner aucun Streptocoque non hémolytique Inversement, un sérum actif contre un Streptocoque non hémolytique, agit sur un certain nombre de Streptocoques non hémolytiques mais n'agit sur aucun Streptocoque hémolytique.

POUVOIR PATHOGÈNE.

Dans les conditions naturelles. — *Chez l'homme.* — Le rôle du Streptocoque en pathologie humaine est tellement étendu que nous ne pouvons même énumérer toutes ses manifestations. Nous signalerons seulement les plus importantes.

Il est l'agent spécifique de l'érysipèle (Fehleisen, Achalme), et l'agent habituel des infections puerpérales sous toutes leurs formes, graves ou bénignes (Widal), du phlegmon diffus, de l'ecthyma

(Thibierge et Bezançon), de l'impétigo (Balzer et Griffon), des piqûres anatomiques (Achalme), des septicémies chirurgicales, etc.

Il intervient fréquemment dans la genèse des angines simples ou des angines pseudo-membraneuses non diphtériques, des bronchopneumonies primitives ou secondaires, des pleurésies purulentes, des phlébites, des arthrites purulentes, de l'ostéomyélite, des otites, des mastoïdites, des méningites suppurées.

On le rencontre moins fréquemment au cours des simples abcès, des endocardites, des péricardites suppurées, des néphrites, et dans certaines septicémies médicales. Ces dernières s'accompagnent volontiers d'éruptions, exanthème, érythème polymorphe ou purpura.

Dans les plaies infectées, et spécialement dans les plaies de guerre, le Streptocoque joue un rôle très important, peut-être même prépondérant. Il paraît être l'agent habituel des infections graves (non gangréneuses) observées dans les premiers jours; à ce titre, sa présence suffit à contre-indiquer la suture primitive (Tissier). Ultérieurement, le Streptocoque intervient encore d'une manière fréquente dans les diverses formes d'infections suppuratives, quelle que soit leur localisation.

En outre, le Streptocoque intervient couramment à titre d'infection surajoutée au cours de nombreuses maladies: variole (Widal et Bezançon), grippe, rougeole, fièvre typhoïde (H. Vincent), rhumatisme articulaire aigu et surtout diphtérie et scarlatine (Marie Raskin); presque toujours l'intervention du Streptocoque marque une aggravation de l'infection primitive (sauf dans le rhumatisme). Sa fréquence dans la scarlatine est telle que nombre d'auteurs ont vu en lui, depuis Bergé, l'agent spécifique de cette fièvre éruptive, mais cette opinion ne semble pas pouvoir être acceptée.

Chez l'animal. — Voyez chap. XII.

Expérimentalement. — *Chez l'homme.* — Divers auteurs, Fehleisen, Koch, ont inoculé à des malades atteints de cancer des cultures de Streptocoques, dans le but de produire un érysipèle curateur. L'inoculation a provoqué le plus souvent l'érysipèle, parfois une septicémie mortelle (Janicke et Neisser).

Chez l'animal. — **Virulence.** — De même que le Staphylocoque, le Streptocoque est doué d'une virulence extrêmement variable; mais la virulence d'un Streptocoque peut être presque toujours exaltée ou abaissée, au gré de l'expérimentateur.

Sans faire de cette proposition une loi absolue, on peut dire que les Streptocoques provenant de lésions ou d'états pathologiques

(érysipèle, phlegmons, septicémies mortelles, etc.) sont assez souvent virulents pour l'animal. Mais les exceptions sont nombreuses.

La virulence diminue d'elle-même par simple vieillissement, surtout au contact de l'air, ou par les cultures sur milieux ordinaires ; elle se conserve, sans s'exalter, sur bouillon-sérum.

Exaltation de la virulence. — *a.* On peut remonter la virulence en inoculant, en même temps que le Streptocoque, le *Proteus vulgaris* (Monti), le *Micrococcus prodigiosus* ou ses produits solubles (Roger), la peptone putréfiée (Achalme), le Bacille typhique ou ses cultures stérilisées (H. Vincent), le Colibacille (Widal et Bezançon).

b. La culture en sang humain défibriné augmenterait également la virulence (Meyer et Ruppel).

c. Le procédé le plus efficace paraît être le *passage successif d'animal à animal.* Marmorek inocule un lapin dans la veine de l'oreille. Quand l'animal a succombé, on prélève le sang du cœur, qu'on ensemence en bouillon-sérum ; après quarante-huit heures, la culture est inoculée à un deuxième lapin, dont le sang sera ensemencé après la mort, et ainsi de suite. Avec cette méthode, en partant d'un Streptocoque qui tuait le lapin en trois jours, à la dose de 1 centimètre cube, Marmorek a pu obtenir en deux mois un virus qui tue à dose infime, $0^{cc},000\,000\,001$; un seul microbe tue l'animal.

Aronson opère de même avec la souris.

d. A l'aide de l'une ou de l'autre méthode, on peut rendre virulents tous les Streptocoques d'origine humaine.

Lapin. — C'est l'animal de choix.

Inoculation a la base de l'oreille. — Le procédé classique est l'injection, à la base de l'oreille, à dose variable suivant la virulence. Dans les expériences d'essais, on inoculera $1^{cc},5$ d'une culture de quarante-huit heures en milieu liquide. Suivant la virulence, les réactions sont différentes.

A l'inoculation d'un *virus très actif* succède une *septicémie* mortelle en vingt-quatre à quarante-huit heures, sans lésion locale.

Les *virus moyennement actifs* — c'est la majorité — déterminent un *érysipèle* : après vingt quatre ou quarante-huit heures, la région inoculée est le siège d'un érysipèle typique, bleuâtre ou rouge, parfois couvert de phlyctènes ; l'oreille est tuméfiée et tombante, infiltrée de sérosité qui renferme des Streptocoques. Il existe en même temps un peu d'hyperthermie avec diarrhée, inappétence. Cet érysipèle peut déterminer la mort en quelques jours, avec ou sans septicémie. Le plus souvent, l'animal survit ; l'érysipèle devient phlegmoneux et suppure, ou bien il guérit sans autre évolution.

Peu virulent, le Streptocoque détermine un simple *abcès*, ou bien une légère rougeur érythémateuse.

Aucune réaction enfin ne se produit avec un microbe dénué de virulence.

Autres inoculations sous-cutanées. — Inoculé en un autre point du tissu cellulaire sous-cutané, le Streptocoque peut déterminer un abcès (sans érysipèle), une septicémie, etc.

Inoculation intraveineuse. — Le procédé est plus sévère que le précédent, mais il ne permet pas d'apprécier aussi facilement la virulence. L'animal meurt en un ou quelques jours. Quand la survie est suffisante, on peut voir survenir des suppurations localisées, spécialement des *arthrites purulentes*. Si on inocule à un lapin jeune, six à dix semaines, une dose telle que l'animal ne meure qu'après au moins huit jours, il apparaît de l'*ostéomyélite* avec suppuration médullaire (Courmont et Jaboulay).

Lésions médullaires consécutives aux injections. — On a vu survenir des accidents médullaires en différentes circonstances : après inoculation intraveineuse, atrophie musculaire progressive (Roger) ; après inoculation sous-cutanée, dans 6 p. 100 des cas, myélite diffuse avec dégénération des cordons blancs, donnant lieu pendant la vie à des paralysies avec troubles des sphincters, dyspnée, contracture. Ces accidents, bien étudiés par Widal et Bezançon, apparaissent une à huit semaines après l'inoculation et tuent en quelques jours.

Souris. — C'est, après le lapin, l'animal le plus sensible, mais les lésions produites sont moins nettes. Un Streptocoque virulent tue par septicémie. Chose curieuse, le Streptocoque de l'érysipèle est généralement — pas toujours — dénué de virulence pour la souris (Lingelsheim).

Cobaye. — Peu sensible, le cobaye réagit seulement à l'inoculation de Streptocoques très virulents (abcès, péritonite, septicémie, suivant la voie d'inoculation).

Rat blanc, chien. — Ils sont réfractaires.

Cheval, âne. — Relativement à leur poids, ces espèces sont très sensibles. D'ailleurs le Streptocoque attaque souvent le cheval dans les conditions naturelles. La sensibilité du cheval et de l'âne est surtout importante à connaître en vue des applications sérothérapiques.

TOXINES.

La toxine streptococcique n'est pas très active.

I. Chantemesse, puis Manfredi et Traversa ont reconnu que les cultures stérilisées par chauffage ou filtration sont encore

toxiques; elles déterminent des parésies et un peu d'hyperthermie.

II. Roger cultive sur bouillie de viande neutralisée, sous l'huile ; après quinze jours, le produit est exprimé et filtré sur bougie : le filtrat est toxique pour le lapin, à la dose de 13 à 20 centimètres cubes par kilogramme d'animal. A dose plus faible, ce filtrat est prédisposant, c'est-à-dire qu'il diminue la résistance de l'animal. Chauffé à 110°, il n'est plus toxique et se montre au contraire vaccinant.

III. Marmorek (1895) obtient une toxine qui tue le lapin à dose de 0cc,5 : culture sur bouillon-sérum, filtration après trois mois.

IV. Le même auteur (1902) indique une nouvelle méthode ; on cultive d'abord le Streptocoque dans un mélange de sérum et de leucocytes provenant de cobayes traités au préalable par le sérum spécifique et, par conséquent, très réfractaires à l'action du Streptocoque. Pour obtenir les leucocytes, on injecte du bouillon dans le péritoine, et on recueille l'exsudat vingt-quatre heures après. De ce premier milieu, le microbe est réensemencé dans un bouillon renfermant 10 p. 100 de chacune des deux solutions suivantes, faites dans le bouillon à 60° et filtrées :

1° Leucine.....	1 p. 375
2° Glycocolle.....	1 p. 200

En ensemençant dans ce milieu un Streptocoque très virulent, le filtrat se montre toxique dès le huitième jour, à la dose de 0cc,25 à 0cc,5. Le principe toxique est détruit par chauffage à 70°.

Cette toxine est utilisée pour préparation d'un sérum.

V. Bonome et Bombici ont obtenu une endotoxine en traitant les corps microbiens par la potasse à 7,5 p. 1 000, filtrant et précipitant par l'acide acétique à 1 p. 100 ; le précipité serait toxique.

Streptocolysine. — La plupart des Streptocoques sécrètent une hémolysine, étudiée spécialement par Besredka, Braun, Mac Leod, etc. L'hémolyse se produit même sur l'animal inoculé (sang dissous, Marmorek). Elle est facilement visible sur les cultures dans le sang gélosé (p. 275). L'hémolysine existe dans les milieux liquides. Besredka préconise de cultiver dans un mélange à parties égales de bouillon et de sérum de cheval ; on filtre après vingt-quatre heures d'incubation. Le filtrat est hémolytique ; 1 centimètre cube de filtrat hémolyse 0cc,5 d'une émulsion de globules rouges de lapin à 5 p. 100, en quinze à cinquante minutes. L'hémolysine dissout les globules de l'homme, du lapin, de la souris, du cobaye. Elle persiste peu dans les milieux de culture, rarement au delà de cinq jours. Elle est assez résistante à la chaleur, n'est guère modifiée par expo-

sition à 65° pendant trente minutes. Certains sérums normaux (homme, lapin) renferment une *antistreptocolysine*.

SIÈGE.

Chez l'homme. — Le Streptocoque fait partie de la flore normale des muqueuses externes. Constant dans la bouche, sur et dans l'amygdale (Widal et Bezançon), il est souvent présent dans le larynx, sur les grosses bronches (von Besser), dans les fosses nasales et le rhino-pharynx.

On trouve en outre le Streptocoque habituellement dans l'estomac et l'intestin, plus rarement dans le vagin (Widal, Winter), dans l'urètre, sur la peau.

A l'état pathologique, le Streptocoque se rencontre dans les diverses lésions que nous avons signalées (p. 277).

Chez l'animal. — L'expansion du Streptocoque est mal connue. Il existe tout au moins à l'état normal dans le tube digestif de la plupart des espèces animales, vache, cheval, etc.

Dans les milieux extérieurs. — Eisenberg a décelé le Streptocoque dans l'air des salles d'hôpital, mais il y persiste peu.

Il existe souvent dans les eaux souillées provenant sans doute des excreta ; c'est un hôte normal des eaux d'égout (Houston).

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic ne peut être porté qu'après constatation du microbe.

Recherche du microbe. — Nous envisagerons seulement la recherche dans l'organisme.

Examen direct. — Sur les exsudats, le pus, etc., on pratiquera des examens directs avec coloration au Gram. La présence de cocci en chaînettes, non capsulés, prenant le Gram, est caractéristique.

Il faut ensuite isoler le microbe en cultures.

Isolement. — Les ensemencements de pus, sérosités purulentes, seront faits de préférence sur milieux solides, gélose ou gélose-sérum, par étalement à la surface. Pour l'érysipèle, piquer le bourrelet et ensemencer le sang.

L'ensemencement des fausses membranes sera pratiqué sur sérum coagulé (milieu qui est en même temps indiqué pour recherche du Bacille diphtérique).

On ensemencera le sang suivant les méthodes indiquées plus loin pour l'hémoculture ; il y a généralement hémolyse quand la culture a bien poussé.

Identification. — Sur les colonies isolées, on vérifiera les caractères du Streptocoque (morphologie, cultures). Il est souvent utile de contrôler la virulence expérimentale; dans ce but, inoculer 1 à 2 centimètres cubes de culture de quarante-huit heures en bouillon-sérum à la base de l'oreille du lapin.

Observations. — La présence du Streptocoque signifie infection streptococcique, lorsque l'expertise porte sur un organe ou un tissu normalement exempt de Streptocoques : suppurations de toutes régions, septicémies, etc. Même en pareil cas, il est toujours indispensable de s'assurer si le Streptocoque est pur, ou s'il est associé à d'autres microbes.

La constatation du Streptocoque dans les produits venant de la gorge (angines) et de toutes les régions normalement habitées par lui ne suffit pas à caractériser une infection streptococcique. En attendant de meilleurs critériums, on ne portera ce diagnostic que si le Streptocoque est très abondant, aussi bien dans les examens directs que dans les cultures.

VACCINATION.

a. La préparation des sérums thérapeutiques oblige à vacciner les animaux (cheval) par des méthodes diverses, que nous étudierons avec la sérothérapie.

b. Roger a pu vacciner le lapin à l'aide de sa toxine vaccinante (V. p. 281) : Marmorek vaccine le même animal en inoculant des cultures vivantes, cultures anciennes d'abord, puis cultures de plus en plus virulentes. Mironoff, puis Gromakowski inoculent d'abord des cultures stérilisées, puis des cultures vivantes.

c. Chez l'homme, Gabritchewsky a tenté de vacciner des enfants contre la scarlatine en inoculant des cultures stérilisées par la chaleur. La conception et les résultats sont problématiques.

d. On a également tenté de vacciner préventivement les blessés de guerre contre l'infection streptococcique (Wright, Levaditi, etc.). Le vaccin était obtenu par l'action de la chaleur, de l'éther et du chloroforme, etc. Les résultats enregistrés sont assez encourageants.

e. On peut conférer à l'animal l'*immunité passive*, en utilisant les propriétés préventives des sérums, dont nous allons parler.

SÉROTHÉRAPIE.

Il existe un grand nombre de sérums antistreptococciques, préparés suivant des méthodes assez diverses, ce qui suffit à montrer qu'on n'a pas encore trouvé la bonne formule de préparation.

La querelle des unicistes et des pluralistes a eu son retentissement dans les tentatives de sérothérapie. Les unicistes ont préparé d'abord un sérum monovalent avec un Streptocoque humain de virulence très exaltée; mais, depuis, Marmorek et Aronson paraissent avoir renoncé au sérum mono-

valent. De même que les pluralistes, ils préparent le sérum en immunisant (au moins en partie) les animaux avec plusieurs échantillons de Streptocoques, inoculés pour ainsi dire à l'état naturel, tels qu'ils sont fournis par les lésions humaines, sans passage par les animaux de laboratoire.

Charrin et Roger ont, les premiers, obtenu un sérum thérapeutique, par immunisation du mulet avec la toxine de Roger.

Depuis lors, tous les sérums ont été préparés par injection de microbes vivants ; Marmorek (deuxième sérum) injecte en même temps sa toxine.

Premier sérum de Marmorek. — On part d'un Streptocoque à virulence exaltée (p. 281), provenant d'une angine à fausse membrane. On inocule au cheval, sous la peau, d'abord de faibles doses (1 centimètre cube en moyenne) de culture en bouillon-sérum ; l'animal réagit fortement (fièvre, œdème local). Quand il est rétabli, on injecte une dose plus forte, et ainsi de suite : après huit à douze mois de traitement, on arrive à inoculer sans accidents des doses énormes, 50 à 100 centimètres cubes. On attend vingt-quatre jours après la dernière inoculation (pour permettre l'élimination du microbe et des toxines) avant de faire la saignée.

Le sérum ainsi obtenu n'est pas bactéricide ; par contre, il est nettement préventif : administrés vingt-quatre heures avant l'inoculation d'épreuve, 2 centimètres cubes de sérum prémunissent le lapin contre l'injection d'une dose de Streptocoque dix fois mortelle. Mais le pouvoir curatif est limité : si on inocule la même dose dix fois mortelle, on peut encore sauver l'animal en administrant, six heures après, 5 centimètres cubes de sérum ; au delà, le sérum échoue.

Deuxième sérum de Marmorek. — Depuis 1896, Marmorek paraît avoir renoncé au sérum monovalent. Le nouveau sérum est un mélange de deux sérums préparés différemment : l'un provient de chevaux inoculés avec la toxine, indiquée plus haut ; l'autre est obtenu par inoculation de cultures de Streptocoques de toutes provenances (42 échantillons). Ce nouveau sérum est donc polyvalent.

Sérum de Besredka (sérum de l'Institut Pasteur de Paris). — Le sérum est polyvalent. On inocule dans les veines du cheval des émulsions de culture sur gélose-sérum (gélose arrosée de sérum) ; à chaque injection, on introduit dix Streptocoques différents, dont neuf de provenance humaine et un exalté par passages successifs sur la souris et le lapin ; ce dernier, sorte de témoin, sert au dosage de l'activité du sérum, les autres Streptocoques étant peu pathogènes pour les animaux de laboratoire. Chaque injection provoque une élévation thermique (plus de 40°), disparue en quarante-huit heures.

Le sérum est expérimentalement curatif et préventif. Pouvoir curatif : on inocule à la souris une dose dix fois mortelle ; vingt-

quatre heures après, il suffit, pour la sauver, d'injecter dans le péritoine 0cc,001 de sérum. Le pouvoir préventif est manifeste avec une dose de sérum dix fois moindre.

Autres sérums. — Le sérum d'Aronson est préparé comme le sérum de Besredka (un virus exalté mélangé à des virus non exaltés). Tavel, Menzer emploient exclusivement des virus non exaltés. Denys inocule plusieurs échantillons de virulence exaltée.

Résultats thérapeutiques. — Il est très difficile d'apprécier les résultats obtenus avec les divers sérums antistreptococciques, parce que, l'érysipèle mis à part, les infections streptococciques sont de gravité très variable. Dans l'infection puerpérale, qui est le plus souvent (pas toujours) due au seul Streptocoque, la plupart des accoucheurs (Budin, Charpentier, etc.) n'ont tiré aucun bénéfice du sérum de Marmorek ; Pinard le considère, par contre, comme un adjuvant très précieux. Il ne semble pas en être de même dans les septicémies chirurgicales. La plupart des sérums préparés dans ces dernières années ne semblent d'ailleurs pas avoir fait l'objet de recherches cliniques régulièrement suivies.

Sérum antiscarlatineux. — Nous avons signalé la conception de Moser: la scarlatine serait provoquée par un Streptocoque spécifique. Imbu de cette idée, Moser prépare un sérum antiscarlatineux par inoculation de plusieurs races de Streptocoques provenant de scarlatineux.

Le sérum de Moser a été employé largement, souvent avec succès. Escherich annonce une mortalité de 6,70 p. 1 000 chez les malades traités, contre 16,41 chez les non traités ; Bokay, Schick et bien d'autres ont obtenu également des résultats encourageants. Par contre, Moltchanoff, Bilik dénient au sérum de Moser toute efficacité. Cette discordance de vues démontre que le sérum n'est pas spécifique, ce qui était d'ailleurs certain ; mais on peut comprendre, d'autre part, qu'un sérum antistreptococcique polyvalent puisse avoir quelque utilité dans une maladie qui s'accompagne communément d'infections à Streptocoques dans ses formes graves.

STREPTOCOQUES D'ORIGINE ANIMALE.

Streptocoque de la mammite streptococcique de la vache. — Ce microbe, décrit par Nocard et Mollereau, présente la morphologie et les caractères de culture du Streptocoque type. Il en diffère par ses réactions colorantes et ses aptitudes pathogènes : il se décolore incomplètement par le Gram ; il n'est pas pathogène pour les animaux de laboratoire ; inoculé dans la mamelle de la vache ou de la chèvre, il reproduit la mammite spécifique,

Streptocoque de l'anasarque du cheval. — Identique en tous points au Streptocoque exalté de Marmorek (Lignières). L'affection est traitée avec succès par le sérum de Marmorek, qui réduit de trois quarts la mortalité.

Streptocoque de la gourme (cheval). — Décrit par Schütz, le

St. equi présente les caractères morphologiques et culturaux du Streptocoque type ; les cultures sur sérum coagulé sont cependant plus abondantes.

Le Streptocoque de la gourme pousse dans les filtrats du Streptocoque type (Marmorek) ; inversement, le Streptocoque ordinaire pousse dans les filtrats du *St. equi* (Pricolo).

La souris est très réceptive. Un virus très actif tue par septicémie ; un virus moins actif produit un abcès local avec infection lymphatique (adénite) et abcès à distance.

Le lapin est également sensible ; le cobaye, beaucoup moins.

L'inoculation au cheval provoque des lésions gourmeuses : abcès (inoculation sous-cutanée), localisations diverses (inoculation intranasale), etc. L'âne et le mulet sont moins réceptifs (Voy. plus haut, p. 270, IV, l'*action des sérums antistreptococciques*).

CHAPITRE XIX

TÉTRAGÈNE

Le Tétragène, ou *Micrococcus tetragenes*, a été vu d'abord par Koch (1895) dans le contenu d'une caverne pulmonaire et étudié ensuite par Gaffky.

L'espèce Tétragène comporte plusieurs variétés. On a pensé tout

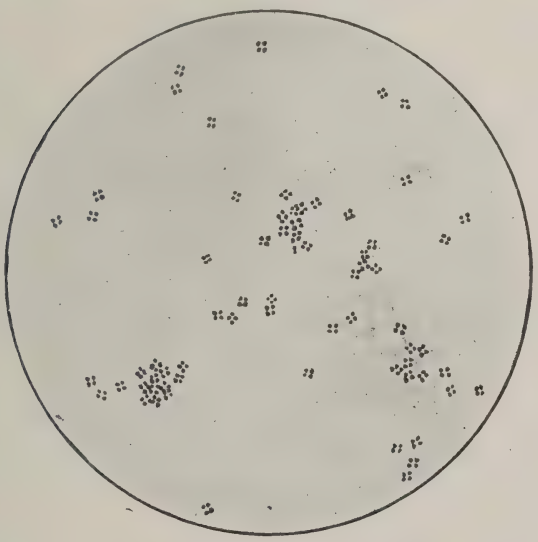

Fig. 144. — Tétragène.

d'abord qu'il fallait séparer le Tétragène virulent (*Tetragenes septicus*) des autres Tétragènes, inoffensifs pour l'animal ; mais les observations ultérieures ont montré que la plupart des variétés, bien qu'habituellement saprophytes, peuvent être éventuellement pathogènes pour l'homme.

Le Tétragène est caractérisé surtout par sa morphologie très spé-

ciale. Ses autres attributs, propriétés culturales, virulence, etc. sont plus contingents.

Le *Micrococcus tetragenes albus* est le mieux étudié.

MORPHOLOGIE.

Caractères microscopiques. — La forme type est une tétrade entourée d'une capsule (fig. 144).

Dans l'organisme (produits d'expectoration, pus, organes), cette forme type se rencontre fréquemment. Chaque élément de la tétrade est un coccus, de diamètre très variable, 1 μ en moyenne, souvent aplati sur les faces d'accolement. La capsule, large, irrégulière, représente volontiers un carré à angles mousses, un peu étranglé sur les faces (aspect de ballot ficelé en croix).

A côté de la tétrade capsulée caractéristique, on trouve d'autres formes atypiques, en cocci isolés, diplocoques, triades, etc. ; la capsule n'est pas constante.

En cultures, les formes capsulées, spécialement la tétrade capsulée, ne se retrouvent que dans un milieu: le sérum liquide de lapin.

Sur tous les autres milieux, la morphologie est atypique. La capsule manque toujours. La forme en tétrade est habituelle, mais non constante; elle peut manquer complètement, faisant place à une morphologie banale: cocci isolés, ou agencés irrégulièrement, rappelant le Staphylocoque.

Coloration. — Le Tétragène se colore facilement. *Il prend le Gram.*

Mobilité, cils, spores. — Immobile. Pas de cils. Pas de spores.

CULTURES.

Conditions générales. — Aérobie, le Tétragène pousse facilement sur les milieux habituels, à partir de 15°; la température eugénésique est 37°.

Bouillon. — D'abord trouble avec dépôt au fond, le milieu s'éclaircit rapidement ; dépôt abondant, visqueux ; la réaction devient nettement alcaline.

Gélatine. — Sur plaques. — Les colonies superficielles sont blanches, un peu gluantes, bombées, atteignant 1 à 2 millimètres de diamètre.

En piqures. — *Culture en clou.* Disque ou bouton blanc à la surface, filet blanc dans la profondeur.

En strie. — Culture blanche, épaisse, gluante.

La gélatine n'est pas liquéfiée.

Gélose inclinée. — Comme sur gélatine en strie.

Pomme de terre. — Comme sur gélatine en strie.

Lait — Non coagulé; développement peu abondant.

Anomalies. — Le Tétragène, défini surtout par son aspect microscopique, ne semble pas constituer une espèce fixe. Les caractères fondamentaux peuvent varier: certains échantillons liquéfient la gélatine (Chauffard et Ramond) ou coagulent le lait.

Variétés. — A côté du *Tetragenes albus*, il existe d'autres variétés. Les plus fréquentes sont chromogènes sur les milieux solides, où elles donnent des cultures jaunes (*T. aureus*), jaunâtres (*T. subflavus*), rouges (*T. ruber*). On a même décrit une variété mobile (*T. mobilis ventriculi*).

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — En cultures, le Tétragène demeure vivant pendant plusieurs mois.

Action des sérums. — Chez l'homme infecté, on peut constater l'existence d'une agglutinine et d'une sensibilisatrice, spécifiques pour l'échantillon infectant (Sacquépée). On recherchera l'agglutinine par le procédé macroscopique.

ACTION PATHOGÈNE.

Dans les conditions naturelles. — *Chez l'homme*, le Tétragène détermine des affections diverses: des septicémies sans localisation (fièvre éphémère, Sacquépée); des septicémies avec pleurésie (Faisans et Le Damany), purpura (Roger et Trémolières), endocardite (Chauffard et Ramond), érythème infectieux; — ou bien des manifestations localisées: abcès dentaires, abcès froids (Boutron), angines à type spécial (angines sableuses, Dieulafoy et Apert), pleurésies purulentes (Netter), gangrène pulmonaire, etc.

Inoculation expérimentale. — Virulence. — La virulence est très variable, tantôt nulle, tantôt considérable. La virulence peut être exaltée par injection de tuberculine ou de cultures stérilisées de Tétragène (P. Teissier).

Les animaux les plus sensibles sont la souris blanche et le cobaye; le lapin résiste plus.

Souris. — Par injection sous-cutanée, quelques gouttes de culture virulente provoquent la mort en un à trois jours; les microbes se trouvent en abondance dans les organes. Au point d'inoculation, il

peut n'exister aucune réaction apparente; le plus souvent on note un abcès, une escarre ou simplement de l'induration.

Cobaye. — P. Teissier a montré que les effets de l'injection varient avec la virulence.

Injecté sous la peau, le microbe peu virulent détermine une escarre sèche. Plus virulent, il provoque la formation d'un abcès caséeux, sans réaction inflammatoire. L'injection d'un virus très actif provoque une collection séreuse ou séro-purulente; l'animal succombe tardivement avec septicémie tétragénique.

Par injection intrapéritonéale, on observe, suivant la virulence: ou bien une hyperémie légère du péritoine; ou bien un exsudat séreux ou hémorragique; ou bien enfin une péritonite purulente généralisée avec pus visqueux et crémeux.

Lapin. — L'inoculation sous-cutanée provoque un abcès froid.

TOXINES.

Les cultures, chauffées trois jours de suite pendant une heure à 60°, sont encore toxiques pour le cobaye par injection intrapéritonéale; l'injection détermine de l'hyperthermie.

Les cultures chauffées à 115°, moins toxiques, provoquent, au contraire, de l'hypothermie (P. Teissier).

Les cultures chauffées ne sont pas pyogènes.

SIÈGE.

Le Tétragène se rencontre dans l'organisme humain:

1° A l'état normal, dans la bouche, le mucus nasal, les fèces; il s'y comporte comme un saprophyte;

2° A l'état pathologique, dans les diverses manifestations locales ou générales signalées plus haut. Il est en outre souvent associé à d'autres microbes pathogènes; c'est à ce titre qu'il est très souvent présent dans les cavernes tuberculeuses du poumon.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic d'une infection à Tétragène ne peut être fixé qu'après constatation du microbe.

Dans les lésions locales, il faut: 1° voir le microbe (forme particulière, résistance au Gram. Les constatations morphologiques sont ici de première importance); 2° le cultiver et vérifier ses caractères. Les ensemencements sur gélose donneront facilement des colonies isolées.

En cas d'infection générale (septicémie), on doit se contenter des

cultures du sang. Il sera alors utile de vérifier par la recherche des anticorps si l'infection est réelle (il pourrait s'agir de contamination accidentelle).

Dans tous les cas, le microbe isolé sera inoculé à la souris ou au cobaye, pour étudier sa virulence sur l'animal et pour essayer de retrouver dans les organes les tétrades capsulées.

L'identification du microbe n'est pas toujours facile. En cultures, on peut confondre avec le Staphylocoque. Il faut voir les capsules. On s'adressera aux inoculations; si le microbe n'est pas virulent, on cultivera en sérum liquide de lapin.

Les autres moyens différentiels : absence de coagulation du lait, absence de liquéfaction de la gélatine, sont parfois en défaut.

PARATÉTRAGÈNE ZOOGLÉIQUE.

Étudié par Bezançon et de Jong, ce microbe paraît être identique au *Tetracoccus buccalis*, décrit antérieurement par Roger.

Il se présente (produits naturels et cultures) sous une forme très particulière : gros placards, formés de diplocoques petits et peu colorés, au milieu desquels tranchent, de place en place, de grosses tétrades plus colorées ; une substance homogène, comme une zooglée, unit tous les éléments. Les grosses tétrades seules prennent le Gram, non les éléments plus petits.

Cultures semblables au *Tetragenes albus*, mais il pousse peu sur gélatine ; il conserve sa forme typique en sérum liquide de lapin.

Saprophyte habituel des voies respiratoires.

CHAPITRE XX

PNEUMOCOQUE

Le Pneumocoque a été décelé tout d'abord par Pasteur, Chamberland et Roux (1881), dans le sang de lapins inoculés avec la salive d'un enfant mort de la rage. On a vu depuis qu'il est, en réalité, un

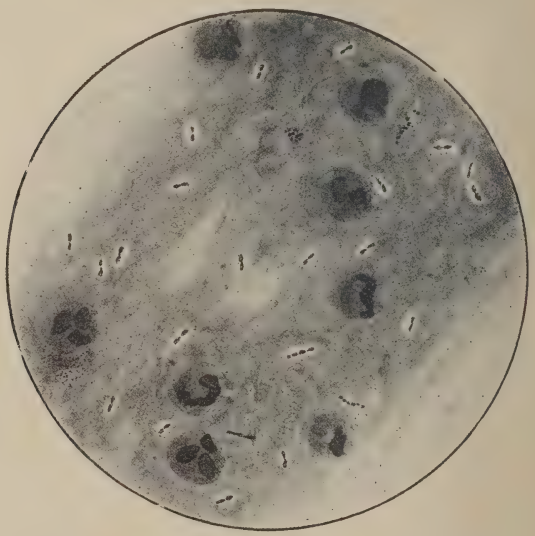

Fig. 145. — Crachats de pneumonie à pneumocoques.

hôte normal de la bouche. Au point de vue pathogène, il est avant tout l'agent de la pneumonie humaine, où il a été étudié par Talamon, puis par Frænkel. Il faut connaître quelques synonymes: *Diplococcus pneumoniæ*, *Diplocoque de Talamon-Frænkel*, *Micrococcus lanceolatus*, *Micrococcus Pasteuri*.

MORPHOLOGIE.

Caractères microscopiques. — *Dans les tissus et produits pathologiques*, la forme type est un diplocoque lancéolé et capsulé (fig. 145 et 148). Chaque élément, de longueur 0μ,5 à 1 μ en moyenne, est allongé et présente une extrémité plus grosse (forme de grain d'orge, de flamme de bougie); les deux éléments s'accolent d'ordinaire par le bout effilé. Moins souvent, le coccus est isolé, ou bien

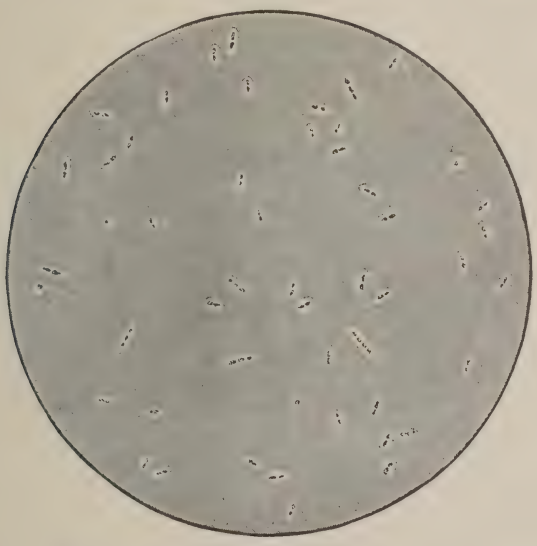

Fig. 145. — Pneumocoque avec capsules négatives (culture en sérum liquide de lapin).

au contraire il forme de courtes chaînettes de diplocoques lancéolés. Dans tous les cas, la capsule entoure l'ensemble de la formation, qu'il y ait un, deux éléments ou plus.

Dans les milieux de culture albumineux, même aspect capsulé et lancéolé ; la capsule est particulièrement nette en sérum liquide de lapin jeune (Bezançon et Griffon; fig. 146).

Dans les milieux non albumineux, la capsule disparaît ; les formes en chaînettes et même en petits amas sont moins rares ; les éléments sont souvent moins allongés : dispositions peu caractéristiques.

Au point de vue morphologique, les divers types de Pneumocoque se ressemblent beaucoup. Toutefois le type III (*Pneumococcus*

mucosus, ancien *Streptococcus mucosus*) est ordinairement moins nettement lancéolé, et sa capsule est à la fois plus grande et plus facilement colorable.

Coloration. — Le Pneumocoque se colore facilement par les couleurs d'aniline. *Il prend le Gram.*

On colorera la capsule par les procédés décrits Chap. XV.

Mobilité. — Spores. — Immobile. Pas de spores.

CULTURES.

Conditions générales. — La culture du Pneumocoque est assez délicate. Il se développe le mieux à 37° (limites extrêmes : 24° et 42°), en présence de l'air (bien qu'étant anaérobie facultatif), en milieux légèrement alcalins. Les milieux d'usage courant donnent de moins bons résultats que certains milieux spéciaux.

I. **Milieux d'usage courant. — Bouillon.** — La culture est peu abondante : le milieu se trouble légèrement en vingt-quatre heures, puis s'éclaircit, en même temps que se forme un dépôt poussiéreux.

Bouillon glucosé à 8 p. 100. — Culture plus abondante (Turro).

Bouillon-ascite. — Comme en bouillon glucosé.

Lait. — Généralement coagulé et acidifié.

Gélatine. — A 24° (gélatine à 15 p. 100), il se développe des colonies maigres, blanchâtres. Pas de liquéfaction.

Gélose. — La culture, peu abondante, est assez typique.

La plupart des échantillons donnent en vingt-quatre heures des colonies petites, transparentes, visibles surtout par réflexion ; aspect de *gouttes de rosée* (Frænkel).

Les Pneumocoques du type III et certains échantillons du type II donnent en vingt-quatre heures des colonies brillantes, translucides, d'aspect muqueux, larges comme une tête d'épingle. Ces colonies confluent facilement, en formant un enduit muqueux. Prélevées au fil de platine, elles s'étirent en filaments.

Sérum coagulé. — Comme sur gélose.

Pomme de terre. — Pas de développement.

II. **Milieux spéciaux. — Milieu de His.** — Les Américains attachent une grande importance à la réaction en milieu de His : on mélange 1 partie de sérum de bœuf à 2 parties d'eau distillée ; après avoir ajouté 1 p. 100 de solution de tournesol à 5 p. 100, on chauffe à 100°. On ajoute enfin 1 p. 100 d'inuline, et on stérilise par chauffage discontinu à 100°. On peut substituer à l'inuline la glucose ou tout autre sucre.

Le Pneumocoque type fermente l'inuline en milieu de Hiss : le milieu rougit et se coagule ; mais il y a de nombreuses exceptions. Le Streptocoque type ne fermente pas.

Sérum liquide de lapin jeune. — Mosny a montré que le sérum de lapin constitue un bon milieu de culture ; Bezançon et Griffon ont préconisé à juste titre le sérum liquide de lapin jeune, milieu d'autant plus favorable que l'animal est plus jeune.

Dans ce milieu, le Pneumocoque pousse abondamment en le troublant uniformément ; il prend le dessus sur les autres microbes et revèt son aspect microscopique caractéristique (diplocoque lancéolé capsulé). C'est un excellent *milieu de diagnostic*.

On peut utiliser également le sérum de jeune cobaye.

Par contre, le sérum de lapin âgé est beaucoup moins favorable.

Gélose-sérum glucosée à 2,5 p. 100 (Buerger). — Colonies en cratère : centre déprimé et transparent, bords surélevés et laiteux (*ring forme*).

Milieux au sang. — Gilbert et Fournier ont reconnu que le sang défibriné est un bon milieu de culture et de conservation, où le Pneumocoque garde assez longtemps sa vitalité et sa virulence.

Sur sang défibriné coagulé (Gilbert et Fournier), la culture en strie donne au milieu une teinte d'abord verdâtre, puis jaune-chamois.

Bezançon recommande comme *milieu de conservation* le *sang de lapin gélosé*. Colonies grisâtres, faisant virer au jaune verdâtre la teinte primitivement brune du milieu ; mêmes caractères sur le *sang humain gélosé* (Schottmüller).

Bouillon au blanc d'œuf alcalin. — En vingt-quatre heures, culture abondante, homogène.

Milieux de Truche, Cramer et Cotoni. — Les auteurs recommandent plusieurs formules différentes, suivant le but cherché.

Milieu pour conserver la vitalité : préparer 4 grammes de peptone Chapotaut (mélange d'albumoses et de peptone), 0gr,50 de sel, 0gr,2 de glucose, compléter d'eau jusqu'à 100 ; alcaliniser légèrement. C'est le *milieu* T. — On peut solidifier en ajoutant de la gélose ; ne pas filtrer la gélose. — Sur ces milieux, le Pneumocoque pousse abondamment.

Milieu pour les premières cultures (au sortir de l'organisme) : ajouter au milieu T un tiers d'ascite.

Milieu pour conserver la virulence : cultiver d'abord dans le milieu T ; à la culture développée, ajouter deux tiers de gélatine à 15 p. 100, préparée avec de l'eau physiologique et alcalinisée ; conserver à la glacière.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le Pneumocoque résiste peu à l'action de la *chaleur*; un chauffage de dix minutes à 56°, ou de quelques secondes à 70°, suffit à le tuer. Il supporte, par contre, une *congélation* de quarante-huit heures (Mosny).

Il est très sensible aux *solutions antiseptiques* usuelles.

Dans les produits organiques (crachats) desséchés, le Pneumocoque, enrobé d'albumine, vit quelque temps, en moyenne trente-cinq jours (Wood), parfois cent quarante jours (Spolverini). Il est également vraisemblable qu'il se conserve longtemps dans les poussières.

Dans les cultures, la vitalité est en connexion étroite avec les conditions de milieu.

Le Pneumocoque périt très vite, en quelques jours, en culture sur les milieux usuels ; mais sa vitalité est beaucoup plus longue sur certains milieux spéciaux, signalés plus haut. Bezançon et Griffon l'ont trouvé vivant après un an, sur sang gélosé ; ils estiment que, dans les milieux albumineux, la vitalité est en raison inverse de l'intensité du développement. Cotoni et Truche, sur leur milieu spécial, ont conservé le Pneumocoque vivant à l'étuve pendant un an, à la glacière pendant deux ans. Carnot et Fournier l'ont gardé vivant pendant sept mois en cultivant sur un filtrat de pulpe cérébrale. La prétendue fragilité du Pneumocoque est donc une légende, née d'une technique insuffisante.

Parmi les causes de déchéance du Pneumocoque dans les cultures, deux ont été discernées : l'air d'une part, l'acidité d'autre part lui sont funestes. Aussi le conserve-t-on plus facilement en pipettes closes, à l'abri de l'air ; et il demeure vivant plusieurs mois dans les milieux ordinaires additionnés de carbonate de chaux, ce dernier saturant les acides formés (Würtz et Mosny).

Réactions biochimiques. — Action dissolvante de la bile (*Phénomène de Neufeld*). — Neufeld a constaté que la bile dissout le Pneumocoque : en versant 0cc,1 ou 0cc,2 de bile de lapin dans 2 centimètres cubes de culture de vingt-quatre heures en bouillon, le milieu s'éclaircit en trois à vingt minutes ; les microbes sont complètement dissous. On peut substituer à la bile des sels biliaires : le « choléate de soude » de Merck (Nicolle et Adil-Bey), qui agit à la dose de 1 p. 1 000, en présence de sulfate de magnésie ; ou bien le taurocholate de soude à 5 p. 100 (R. Lévy). La présence d'ascite ou des sucres fermentescibles gêne la réaction.

D'après Cotoni, seuls les Pneumocoques virulents sont solubles dans la bile ; les Pneumocoques avirulents au contraire sont insolubles. Cette propriété est donc inconstante.

Fermentation des sucres. — Le Pneumocoque, cultivé en mi-

lieu de His, fermente la glucose, la lactose, la saccharose. Nous avons vu que la fermentation de l'inuline est considérée par His comme un caractère constant de grande valeur différentielle (le Streptocoque type ne fermentant pas l'inuline), mais cette constance est très discutée (Berry, Buerger).

Parmi les produits de fermentation, Würtz et Mosny ont trouvé de l'acide formique.

Action du sel. — Le Pneumocoque végète mal dans les milieux renfermant plus de 8 p. 1 000 de chlorure de sodium (Gilbert et Carnot).

Réaction à l'égard des sérums. — Agglutination. — Bezançon et Griffon (1897) ont montré les propriétés agglutinantes du sérum chez l'homme infecté ou chez l'animal inoculé.

Il faut recourir au procédé des cultures (Chap. IV). Le sang est recueilli *aseptiquement* : chez l'homme, par ponction de veine ; on récolte le sérum, bien clair; on ensemence le Pneumocoque d'une part dans ce sérum, d'autre part dans un sérum humain normal. Alors que le Pneumocoque conserve son aspect type dans ce dernier milieu, il se modifie dans le sérum agglutinant : l'examen microscopique, après vingt-quatre heures à 37°, montre des amas ou bien des chaînettes enchevêtrées, avec très peu de diplocoques. D'après Neufeld, les sérums forts donnent des cultures en amas; les sérums moins actifs donnent des cultures en chaînettes.

Le pouvoir agglutinant du sérum apparaît au cours des diverses infections à Pneumocoques (Voy. plus loin) ; dans la pneumonie franche, il est bien marqué vers le sixième ou septième jour et diminue après guérison, pour disparaître après quelques semaines.

Les applications pratiques du séro-diagnostic sont limitées.

Expérimentalement, par inoculation aux animaux, on peut obtenir des sérums agglutinants spécifiques. Cette étude, devenue très importante, sera reprise plus loin (Voy. *Classification*).

Autres anticorps. — Il existe une précipitine dans le sérum des pneumoniques (Wadsworth) et dans le sérum des animaux immunisés (Neufeld).

Les mêmes sérums, humain (Römer) ou animal, renferment une sensibilisatrice.

CLASSIFICATION DES PNEUMOCOQUES.

Quelques caractères morphologiques et culturaux, déjà signalés, permettent de soupçonner — non d'affirmer — qu'on se trouve en présence du *Pneumococcus mucosus* (type III).

Mais ces moyens de différenciation n'ont pas grande valeur. La classification des Pneumocoques est actuellement basée sur l'action des sérums spécifiques.

Les classifications proposées ont pris pour base les réactions d'agglutination ou de précipitation.

I. **Classification des auteurs américains** (Dochez et Gillepsie, etc.). — A. Dochez et Gillepsie, Avery, etc., reconnaissent quatre types : I, II, III et IV (le type III est *Pneumococcus mucosus*).

Type I. — Les sérums agglutinants spécifiques sont obtenus par inoculation à l'animal des germes du type I.

De tels sérums spécifiques agglutinent, à un taux déterminé, les Pneumocoques du type I ; ils n'exercent au contraire aucune action sur les Pneumocoques des trois autres types.

Inversement, les Pneumocoques du type I ne sont pas agglutinés par les sérums spécifiques pour d'autres types.

Type II. — Il existe dans ce groupe :

1° Des échantillons typiques, constituant le « type II » proprement dit, sans épithète ;

2° Des échantillons atypiques, constituant des groupements « atypiques », dénommés sous-groupes II^a, II^b, II^x.

Vis-à-vis d'un sérum spécifique préparé par inoculation de Pneumocoques groupe II typiques :

Les échantillons II typiques sont agglutinés normalement, c'est-à-dire jusqu'aux environs de la limite d'action du sérum ;

Les échantillons II atypiques, sans échapper à l'action du sérum, se montrent toutefois beaucoup moins sensibles que les précédents. Leur taux d'agglutination limite se montre moins élevé ; et pour une même dilution de sérum, les échantillons atypiques sont moins rapidement agglutinés.

Ni les échantillons typiques, ni les échantillons atypiques ne sont agglutinés par les sérums spécifiques pour les autres types, I et III.

Type III. — *Mutatis mutandis*, mêmes caractères que pour le type I : les sérums III sont actifs exclusivement sur les germes du type III ; les germes de ce type ne sont pas agglutinés par les sérums d'autres types.

Notons que les sérums agglutinants III sont généralement moins actifs que les sérums I ou II.

Type IV. — N'a pas d'existence propre. C'est un groupement négatif, où sont rangés les échantillons non agglutinés par l'un ou l'autre des trois sérums précédents.

Technique de l'agglutination. — A titre d'exemple, nous reproduisons ci-dessous la technique de Blake, applicable soit aux cultures, soit aux exsudats péritonéaux pneumococciques de la souris, dont nous parlerons à propos du « Diagnostic de l'infection ».

ÉMULSION DE PNEUMOCOQUES. 0cc,5	SÉRUM I au 20e : 0cc,5.	SÉRUM II non dilué : 0cc,5.	SÉRUM II au 20e : 0cc,5.	SÉRUM III au 5e : 0cc,5.
Type I.....	++	—	—	—
Type II.....	—	++	++	—
Sous-groupes.. ..				
II, *a*, *b*, *x*.....	—	+	—	—
Type III.....	—	—	—	++
Groupe IV.....	—	—	—	—

Placer une heure à 37°. L'agglutination des types I, II et III est pratiquement toujours immédiate, et rien ne se produit dans les sérums hétérologues. Les échantillons II atypiques ne sont au contraire agglutinés que plus tard (attendre une heure) et seulement par le sérum II non dilué. Si après une heure rien ne s'est produit, et si l'échantillon est soluble dans la bile, on le classe dans le groupe IV.

B. — L'étude des propriétés précipitantes des sérums spécifiques aboutit à une classification identique à la précédente.

II. **Classification de M. Nicolle et Debains.** — M. Nicolle, Jouan et Debains ont montré que les Pneumocoques du groupe IV des auteurs américains, considérés comme inagglutinables, peuvent, en réalité, être rendus agglutinables par l'un ou l'autre sérum, après traitement par le procédé de Porges: le culot d'une culture, dilué dans l'eau physiologique, est additionné de solution normale d'HCl, en quantité variable suivant les échantillons: 1/10 à 5/10 de centimètre cube pour 20 centimètres cubes d'émulsion microbienne; porter ensuite cinq minutes à 100° (eau bouillante); refroidir; neutraliser en ajoutant la quantité voulue de solution normale de soude. L'émulsion ainsi traitée est prête pour l'agglutination; or, elle se montre agglutinée par l'un ou l'autre des sérums spécifiques. Il résulte de là que le groupe IV des auteurs américains se trouve supprimé, les échantillons qui le composent rentrant, suivant le cas, dans l'un ou l'autre des types spécifiques.

D'après l'action des sérums expérimentaux, et en utilisant quand il y a lieu le procédé de Porges, M. Nicolle et Debains aboutissent à la classification suivante:

Types I, II et III, correspondant aux types I, II et III des auteurs américains;

Type IV, spécifique comme les précédents, et constitué par un groupe d'échantillons isolés chez les nègres. — Noter que ce

type IV, avec agglutination spécifique, ne correspond plus au type IV, négatif, des Américains.

Nicolle et Debains signalent en outre que bon nombre de Pneumocoques sont agglutinés à la fois par deux et même trois sérums.

III. **État de la question.** — Tenant compte des faits actuellement établis, on doit considérer comme définitive l'édification des types I, II (typique) et III des deux classifications précédentes, qui semblent d'ailleurs renfermer la majorité des échantillons étudiés jusqu'ici.

En dehors de ces trois types, l en existe d'autres, moins répandus pour le moment, et dont les relations exactes avec les types fondamentaux ne sont pas toujours bien définies. L'histoire du type IV de Nicolle et Debains, très fréquent à un moment donné chez les nègres, montre que ces types supplémentaires peuvent prendre à leur tour une expansion appréciable.

ACTION PATHOGÈNE.

I. **Dans les conditions naturelles.** — *Chez l'homme.* — Le Pneumocoque est l'agent spécifique de la pneumonie lobaire.

On le rencontre souvent dans nombre de processus suppuratifs: il est l'agent le plus habituel des méningites sporadiques (dans 18 cas sur 31, Netter); agent fréquent des pleurésies purulentes, des péritonites suppurées; agent occasionnel des abcès, des arthrites, des ostéomyélites, des otites suppurées, de l'infection puerpérale.

Il provoque également des processus non suppurés: conjonctivite aiguë, angines simples ou pseudo-membraneuses, bronchite simple, bronchopneumonie, pleurésie fibrineuse, néphrite, endocardite.

Ces diverses localisations anatomiques peuvent être ou primitives, ou secondaires à une pneumonie.

Il détermine assez souvent des septicémies.

Chez l'animal. — Quelques septicémies du cobaye (Voy. chap. XII).

II. **Inoculations expérimentales.** — *Chez l'homme.* — Les deux frères Klemperer se sont inoculé sous la peau la dose de culture mortelle pour le lapin; l'un d'eux a présenté un peu de tuméfaction locale et un malaise passager; l'autre n'a pas réagi. Comparativement à d'autres espèces animales, l'homme est certainement doué d'une grande résistance.

Chez les animaux. — **Virulence.** — La virulence est assez variable. Originellement, l'inoculation des crachats pneumoniques détermine à peu près toujours une infection pneumococcique mor-

telle ; au contraire, les premières cultures obtenues avec ces mêmes crachats sont loin d'être toujours virulentes (Duval et Lewis).

La virulence baisse rapidement dans la plupart des milieux artificiels ; elle se conserve mieux sur certains milieux spéciaux (sang gélosé, milieu T-gélatine) signalés à propos des cultures. Le procédé suivant suffit généralement à conserver le Pneumocoque virulent pendant plusieurs mois : inoculer au lapin ; après la mort, recueillir le sang du cœur, conserver en ampoule scellée, à l'obscurité et au frais. Au moment de l'emploi, cultiver dans les milieux habituels et inoculer cette culture.

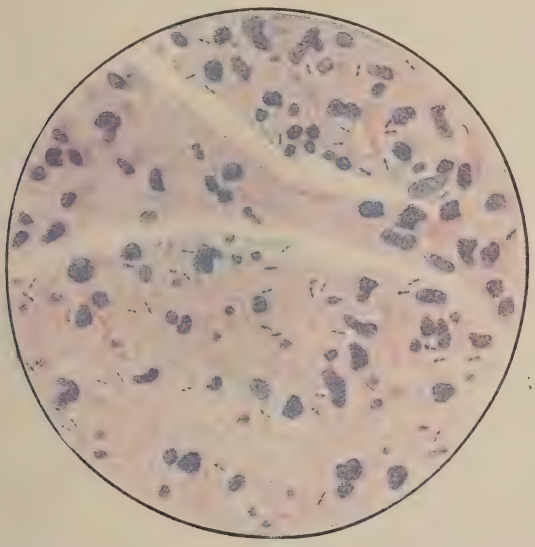

Fig. 147. — Coupe de poumon atteint de pneumonie (coloration par le Gram).

D'après Truche, Cramer et Cotoni, les Pneumocoques, originellement très virulents pour la souris, gardent leur virulence après des passages répétés (162 passages) chez cet animal. Au contraire, les échantillons moins virulents s'atténuent au fur et à mesure des passages.

Exaltation de la virulence. — On peut exalter la virulence en inoculant avec la culture un filtrat de culture du *Proteus vulgaris*.

Issaëff a recours aux passages successifs.

On prélève 1 à 1cc,5 de sang chez un lapin mort de septicémie pneumococcique ; injecter dans le péritoine d'un deuxième lapin ; après la mort, prélever le sang du deuxième lapin, injecter dans le péritoine d'un troisième, et ainsi de suite. Diminuer progressivement les doses à partir

du dixième au douzième passage. On arrive à obtenir un virus tel que IV à VI gouttes de sang tuent le lapin en douze à quinze heures (sous la peau).

Comme beaucoup d'autres microbes, le *Pneumocoque détermine des lésions locales d'autant moindres que l'infection est plus sévère*, et inversement.

Souris. — Extrêmement sensible, la souris blanche ou grise constitue un excellent réactif du Pneumocoque. On peut inoculer par scarification (base de la queue) ou par injection sous-cutanée ;

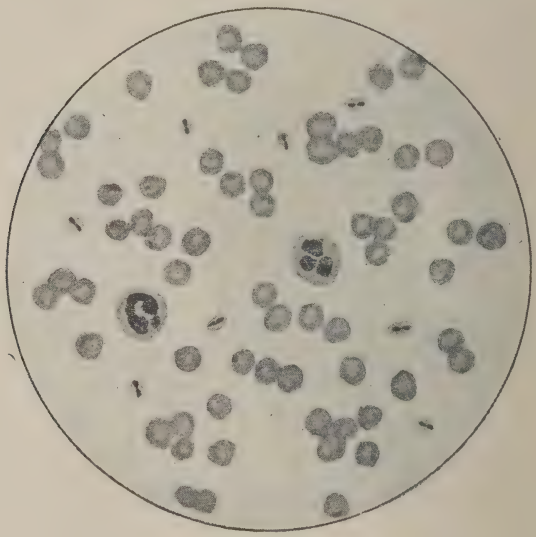

Fig. 148. — Sang de souris infectée par le Pneumocoque. Capsules colorées.

l'animal meurt généralement en vingt-quatre heures ou moins, si le microbe est virulent. Peu (œdème) ou pas de lésion locale. A l'autopsie : sang dissous, rate grosse ; le Pneumocoque pullule dans le sang (fig. 148), les viscères et les tissus.

Lapin. — Très sensible, moins que la souris.

Un Pneumocoque très virulent, injecté *sous la peau*, à la dose de 1 centimètre cube, tue l'animal en vingt-quatre à quarante-huit heures. Léger œdème au point d'inoculation ; purpura viscéral (gros intestin surtout, Carnot et Fournier) et purpura sous-cutané (Foa, Bezançon et Griffon). Le Pneumocoque est très abondant partout (*Pneumocoque hémorragique* de Foa).

Moins virulent, le Pneumocoque provoque une lésion locale plus marquée, œdémateuse ou pseudo-membraneuse ; la mort est plus tardive (*Pneumocoque œdématogène* de Foa). Un Pneumocoque peu virulent, inoculé sous la peau, peut produire à distance des abcès ou des arthrites purulentes (Bezançon et Griffon).

L'injection *intratrachéale* provoque parfois — rarement — une pneumonie lobaire. L'injection *intracérébrale* est particulièrement sévère (Carnot et Fournier).

Rat blanc. — Moins sensible, il faut des doses plus élevées pour tuer l'animal. L'œdème local est très étendu. Quelques Pneumocoques dans le sang.

L'inoculation intrapulmonaire provoque une pneumonie.

Mouton. — Moins sensible encore que le rat blanc ; mêmes réactions après injection sous-cutanée.

L'inoculation intratrachéale, inefficace chez l'animal non préparé, détermine la pneumonie quand on inocule au préalable dans la trachée du tartre stibié (Gamaleia).

Chien. — Mêmes réactions que le rat, à doses plus fortes. L'inoculation intratrachéale reproduit parfois la pneumonie (Tchistovitch).

Cobaye. — Très réfractaire, il succombe pourtant à l'injection intrapéritonéale de virus très actifs.

Oiseaux. — Réfractaires.

TOXINES.

Le pouvoir toxique du Pneumocoque paraît très limité.

Toxines dans les cultures. — I. Les cultures filtrées, ou stérilisées par la chaleur (58°) ou par le chloroforme, sont peu toxiques (Issaëff). Foa et Bonome, puis les frères Klemperer ont cependant avancé que le précipité alcoolique des cultures, poudre blanc jaunâtre qu'ils appellent *pneumotoxine*, redissous dans l'eau, est toxique pour le lapin; il est détruit à 60°. Le précipité obtenu par le sulfate d'ammoniaque est beaucoup moins toxique.

II. Carnot et Fournier (1900) signalent des résultats plus appréciables. Ils cultivent le Pneumocoque dans un tube à essai perforé et couvert d'une membrane de collodion ; le tube plonge dans un milieu nutritif, qu'on peut prélever ou remplacer à volonté. Le Pneumocoque y vit pendant des mois. Par dialyse les toxines passent dans le milieu extérieur au tube. Ce liquide, concentré dans le vide, est toxique pour le lapin ; l'inoculation provoque surtout des lésions musculaires : dégénérescence et rupture des muscles, surtout aux lombes ; cœur gros et de teinte feuille morte. L'injection dans le poumon reproduit les diverses formes des lésions pneumococciques humaines : pneumonie franche, pneumonie grise, pneumonie épithéliale.

Toxines dans les organes. — I. La macération aqueuse d'organes et de muscles des animaux qui ont succombé à l'infection pneumococcique

se montre légèrement toxique (Foa et Bonome, Emmerich, Mosny).

II. Issaëff (1893) s'adresse au sang Quatre lapins sont inoculés avec le virus exalté (p 301); après la mort, on recueille et mélange le sang des quatre animaux, on ajoute volume égal d'eau glycérinée à 1 p. 100 et alcalinisée (V à VI gouttes de solution concentrée de bicarbonate de soude p. 100 centimètres cubes); après mélange, on filtre. Le liquide obtenu, peu toxique, tue *quelquefois* le lapin à la dose de 20 à 30 centimètres cubes. La toxicité est atténuée par chauffage à 70°, détruite à 100°. Les exsudats péritonéaux recueillis chez les mêmes animaux sont également un peu toxiques après filtration.

SIÈGE.

Dans les conditions naturelles, le Pneumocoque ne se rencontre guère que chez l'homme; exceptionnellement, chez des animaux affaiblis (Voy. Chap. XII).

Chez l'homme, à l'état normal, le Pneumocoque est un parasite habituel de la bouche et de ses annexes; il existe dans la salive, plus souvent chez les anciens pneumoniques (4 fois sur 5) que chez les autres (1 fois sur 5) d'après Netter ; dans la bouche et le rhino-pharynx, His le rencontre 85,7 fois sur 100 sujets; Bezançon et Griffon l'ont décelé d'une manière constante à la surface de l'amygdale. La virulence diminue chez les anciens pneumoniques pendant deux semaines après la guérison, pour réapparaître ensuite (Netter); elle serait plus marquée pendant l'hiver.

Il existe également parfois, à l'état normal, dans les fosses nasales et même le poumon.

A l'état pathologique, le Pneumocoque se rencontre tout d'abord dans les lésions qu'il provoque (Voy. p. 300), dans le bloc pneumonique (fig. 147) et dans les crachats; dans certaines collections et sérosités purulentes, etc. Il peut, en outre, parfois être décelé dans le sang, spécialement au cours de la pneumonie.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic bactériologique est basé exclusivement sur la constatation du microbe.

Recherche du microbe. — Les moyens de recherche comportent l'examen direct, la culture et l'inoculation.

I. Les **crachats** seront soumis tout d'abord à l'*examen direct* : coloration au Gram, coloration des capsules. Cet examen est indispensable, mais il ne suffit pas pour affirmer un diagnostic, car il existe d'autres microbes susceptibles de présenter le même aspect (surtout l'Entérocoque). On complétera le diagnostic *en inoculant* à

la souris ou, à défaut, au lapin. En raison de leur sensibilité élective, ces animaux réalisent un véritable isolement. La souris étant très sensible même au Pneumocoque normal de la salive, on aura soin de laver au préalable les crachats (Chap. XIII) pour les débarrasser de salive. Si l'animal succombe, on cherchera le Pneumocoque (examen direct, ensemencements sur les divers milieux) dans les organes et tissus. Nicolle recommande spécialement l'ensemencement du cerveau, moins sujet aux infections cadavériques.

Si l'on voulait obtenir des *cultures* en partant des crachats, toujours impurs, on procéderait au lavage comme ci-dessus, pour ensemencer ensuite sur milieu solide (agar-sérum ou agar-sérum-glucose) par étalement. On échoue parfois.

II. Le **suc pulmonaire** obtenu par ponction, le **pus**, les **sérosités** (celles ci après centrifugation) seront soumis à l'examen direct, puis à la culture : ensemencements simultanés sur milieux solides, pour tâcher d'obtenir d'emblée des colonies isolées; et en milieux liquides, qui seront utilisés seulement si les premiers n'ont pas réussi, et traités ensuite de manière à obtenir des colonies isolées, soit par isolement sur milieux solides, soit par inoculation à l'animal et ensemencements après la mort.

On procédera de même pour les prélèvements opérés *sur le cadavre*.

III. La recherche **dans le sang** sera effectuée par culture (Voy. chap. XLVII); il faut ensemencer au moins 5 à 10 centimètres cubes de sang. Bien entendu, les milieux à la bile ne sont pas utilisables.

Identification. — Sur les cultures obtenues soit directement (hémoculture), soit après passage par l'animal (crachats), on vérifiera les caractères morphologiques et culturaux décrits ci-dessus. Le Pneumocoque ne pourrait guère être confondu qu'avec l'Entérocoque (p. 313), mais ce dernier est beaucoup plus polymorphe, et ses caractères de culture sont un peu différents.

Identification du type. — Désormais on doit s'efforcer de déterminer exactement à quel type appartient tout Pneumocoque pathogène. Cette identification du type deviendrait même indispensable si la sérothérapie aboutissait à la production de sérums monovalents, spécifiques respectivement pour un type classé.

I. Lorsqu'on a obtenu le Pneumocoque en culture pure, il sera facile de l'identifier d'après les réactions d'agglutination à l'égard des sérums agglutinants spécifiques.

II. Au point de vue de l'application pratique de la sérothérapie, il est souvent nécessaire d'opérer très vite, pour injecter le plus tôt possible le sérum spécifique, sans attendre l'isolement strict des colonies. Plusieurs

procédés ont été préconisés pour la pneumonie, affection le plus souven en cause.

a. **Culture in vivo chez la souris ; agglutination.** — Examiner le crachat. S'il existe du Pneumocoque, prélever une portion de crachat grosse comme un haricot, laver à l'eau physiologique, broyer en ajoutant peu à peu 1 centimètre cube de bouillon stérile, inoculer 0,5 à 1 centimètre cube dans le péritoine de la souris. En cinq à vingt-quatre heures, ordinairement six à huit heures, le Pneumocoque s'est bien développé, ce dont on aura soin de s'assurer par examen direct de la sérosité.

A ce moment, tuer la souris ; diluer l'exsudat péritonéal dans 4 ou 5 centimètres cubes d'eau physiologique; centrifuger une première fois doucement, pour précipiter les éléments cellulaires. Reprendre le liquide surnageant, centrifuger à fond ; récolter le dépôt de germes, émulsionner dans l'eau physiologique pour obtenir une densité convenable (comme une culture bouillon dix-huit heures).

Soumettre cette émulsion à l'agglutination par les différents sérums, suivant la technique indiquée plus haut (Blake).

b. **Culture in vivo chez la souris ; précipitation.** — Opérer d'abord comme pour *a* : inoculer la souris, sacrifier en temps voulu ; centrifuger de suite à fond l'émulsion d'exsudat péritonéal. Recueillir le liquide surnageant. Mélanger par fraction de 0,5 centimètre cube avec les sérums spécifiques, dilués aux taux voulus, soit respectivement pour chaque tube :

0cc,5 de sérum	I dilué à 1 p. 10 ;
0cc,5	—	II non dilué ;
0cc,5	—	II dilué à 1 p. 10 ;
0cc,5	—	III — à 1 p. 5.

Un précipité se produit uniquement dans le tube renfermant le sérum spécifique pour le type présent.

Dans l'expérience ainsi conduite, les précipitines apparaîtraient un peu plus tôt que les agglutinines.

c. **Culture in vitro ; précipitation.** — Avery ensemence le crachat en bouillon glucosé additionné d'hématies ; après cinq heures, centrifuger doucement pour précipiter les éléments anatomiques ; recueillir le liquide surnageant; l'additionner de bile; procéder ensuite à la précipitation comme ci-dessus.

VACCINATION.

1. **Par les toxines.** — On arrive assez facilement à vacciner les animaux en leur inoculant à doses croissantes des cultures stérilisées par la filtration, la chaleur ou le chloroforme (Issaëff), 10 à 50 centimètres cubes.

Mêmes résultats après inoculation de *pneumotoxine* ou des toxines d'organes de Mosny, Issaëff, etc.

Les corps de microbes tués par la chaleur (endotoxine) ont été également utilisés avec succès par Foa et Scabia, par Neufeld et Hændel ; de même le suc de microbes broyés après addition de 1 p. 1 000 de potasse (Mac Fadyen).

Dans tous les cas, les animaux sont immunisés seulement contre le microbe, non contre la toxine. Ils sont même souvent plus sensibles aux toxines que les animaux neufs (Issaëff).

II. **Par la solution biliaire.** — La solution biliaire obtenue dans l'expérience de Neufeld est également vaccinante.

III. **Par les cultures atténuées.** — On a employé avec succès les cultures atténuées : d'abord cultures de cinq à six jours, puis cultures virulentes (Netter).

Sergent a de même vacciné à l'aide de cultures atténuées par les colorants : une émulsion de culture sur gélose est additionnée de solution aqueuse de kristall-violet ; après une heure, les microbes sont colorés, mais vivants. Ces microbes colorés, injectés dans les veines ou le péritoine du lapin, agissent comme vaccin ; en répétant les injections, on confère aux animaux une immunité solide.

IV. **Applications pratiques de la vaccination.** — A diverses reprises on a tenté de protéger l'homme contre l'infection pneumococcique, à l'aide de vaccins : Wright, Maynard, Borrel, Lafforgue et Kérandel, Cecil et Austin, etc. La plupart des essais paraissent satisfaisants. Étant donné la pluralité des Pneumocoques, il est nécessaire de vacciner contre les divers types présents dans la population soumise à la vaccination. C'est ainsi que Cecil et Austin ont obtenu des résultats appréciables en inoculant à hautes doses (24 milliards de germes en 4 injections) un mélange de Pneumocoques I, II et III, stérilisés à 55°.

SÉROTHÉRAPIE.

Sérum de pneumonique convalescent. — Le sérum de pneumonique convalescent possède des propriétés préventives et curatives à l'égard de l'infection expérimentale (Charrin et Roger, Klemperer). Un sérum prélevé trente six heures après la crise est curatif pour la souris inoculée, à dose de 0cc,2 (Neufeld et Hændel).

Sérums expérimentaux. — On a prêté aux sérums d'animaux vaccinés des propriétés antitoxiques (Klemperer) et bactéricides (Emmerich) : c'est inexact. Le Pneumocoque pousse dans le sérum d'animaux fortement vaccinés, un peu modifié (culture agglutinée), mais sans perdre sa virulence ; il n'est antitoxique ni chez l'animal, ni *in vitro* ; car l'inoculation successive de sérum et de toxines, ou l'inoculation d'un mélange de sérum et de toxines, se montrent aussi actives que l'inoculation des toxines seules (Issaëff).

Le sérum est préventif et curatif : 4 à 5 centimètres cubes inoculés au lapin et en même temps qu'une dose environ cinq fois mortelle

assurent la survie (Issaëff). Les Klemperer ont pu guérir la pneumococcie du lapin en lui administrant 8 centimètres cubes de sérum, vingt-quatre heures après inoculation d'une dose mortelle. Le sérum de Pane pourrait guérir le lapin inoculé une heure auparavant avec une dose vingt fois mortelle.

Préparation des sérums thérapeutiques. — Les premiers expérimentateurs ont inoculé du sérum de lapins, vaccinés comme il a été dit ci-dessus. Depuis, on s'est adressé aux grands animaux, en inoculant de préférence des microbes de virulence exaltée (celui de Pane tuait le lapin à dose de 0cc,000 01 de culture en bouillon).

La plupart des auteurs inoculent d'abord des cultures stérilisées par la chaleur, puis des microbes vivants. On s'adresse généralement à un seul animal (âne ou vache, Pane; cheval, Washbourn, Neufeld et Hændel). Römer, estimant qu'un seul animal ne réagit pas à tous les récepteurs du Pneumocoque (théorie d'Ehrlich, Chap. III), immunise trois espèces différentes; mouton, bœuf et cheval, et mélange leurs sérums.

La plupart des auteurs américains préparent des sérums spécifiques respectivement pour chacun des types I, II et III. Cole et Moore inoculent au cheval des germes très virulents, dans les veines, d'abord sous forme d'émulsions stérilisées à 56°, puis sous forme de cultures vivantes. D'après Wadsworth et Kirkbride, le sérum I serait le plus actif; la valeur des sérums II est variable; le sérum III se montre peu protecteur chez l'animal.

Truche inocule au cheval, dans les veines, des Pneumocoques très virulents tués par l'alcool-éther. Il est préparé quatre sérums, répondant aux quatre types de Nicolle et Debains (Voy. plus haut). Les sérums sont d'abord spécifiques au point de vue préventif, mais quand ils atteignent une grande activité, ils deviennent polyvalents.

Application à l'homme. — Divers auteurs, Weisbecker, Audéoud, etc., ont inoculé au pneumonique le sérum de convalescents de pneumonie, avec quelques succès. Mais on ne saurait approuver cette méthode, qui pourrait inoculer des virus dangereux.

Les sérums expérimentaux ne semblent pas avoir fait l'objet d'études suivies. Les quelques résultats annoncés sont pourtant encourageants. Un assez grand nombre de pneumoniques ont été traités par le sérum de lapins vaccinés: 18 cas des Klemperer, 10 de Foa et Scabia, 10 de Janson, etc., avec un succès à peu près constant. Les sérums de grands animaux paraissent de même assez actifs: Römer dit avoir traité 68 cas de pneumonie, avec 2 décès: les résultats annoncés par Pane, de Renzi, de même que par Washbourn, Harvett, ne sont pas moins favorables.

Pour l'application du sérum de Truche au traitement de la pneumonie, Cruveilhier recommande la voie intraveineuse. Les résultats obtenus jusqu'ici paraissent très encourageants.

CHAPITRE XXI

ENTÉROCOQUE

L'Entérocoque, entrevu par divers auteurs, a été isolé et bien étudié par Thiercelin (1899). Son histoire est encore incomplète.

Fig. 149. — Entérocoque (culture en bouillon).

MORPHOLOGIE.

Caractères microscopiques. — L'Entérocoque est *protéiforme* (Jouhaud), mais ce caractère paraît avoir été quelque peu exagéré.

Sans errer beaucoup, on peut dire que l'Entérocoque rappelle le Pneumocoque dans l'organisme et le Streptocoque dans les cultures en bouillon.

Dans l'organisme, la forme ordinaire est un diplocoque lancéolé et auréolé. Les deux éléments du diplocoque sont souvent dissemblables, l'un d'eux étant arrondi, l'autre ovoïde ; ils sont parfois disposés en accent circonflexe (aspect en besace). Assez souvent les diplocoques se disposent bout à bout pour former des chaînettes. Dans une même préparation, les éléments sont de taille très variable. L'auréole, fréquente dans les selles pathologiques (entérite), dans les crachats, le pus, habituelle chez la souris inoculée, serait plus rare dans les selles normales.

Dans les cultures (fig. 149), la morphologie varie suivant les milieux. Sur bouillon (cultures de vingt-quatre heures), on trouve généralement de courtes chaînettes de diplocoques (diplo-streptocoques), mélangées à des diplocoques, avec quelques petits amas peu cohérents, des formes en tétrade ou en trièdre et des éléments bacillaires courts. L'auréole existe souvent dans la première génération pour disparaître ensuite. Les cultures anciennes donnent des formes d'involution très variées: filaments géants, filaments moniliformes (avec étranglements), formes en massues, énormes boules, etc.

Sur gélose, le polymorphisme augmente, les chaînettes étant plus rares et les amas plus fournis.

En sérum de lapin jeune, on trouve surtout des amas de chaînettes enchevêtrées ou accolées (Bezançon).

Coloration. — L'Entérocoque se colore bien par les couleurs d'aniline. *Il prend le Gram.*

Spores. — **Mobilité**. — Pas de spores. Immobile.

CULTURES.

Conditions générales. — Anaérobie facultatif ; la température optima est 37°.

Bouillon. — Après vingt-quatre heures, trouble avec dépôt. Après quelques jours, le liquide s'éclaircit ; il s'est formé au fond un dépôt adhérent, que l'agitation soulève en tire-bouchon sans le dissocier dans le liquide. C'est un bon caractère différentiel.

Lait. — Coagulé en un ou deux jours (inconstant).

Sérum liquide et sérosité d'ascite. — Culture maigre, floconneuse.

Gélose inclinée. — Colonies petites, d'abord transparentes, bleutées ; elles deviennent ensuite opalescentes ou opaques.

Sérum coagulé. — Culture très maigre, sèche.

Gélatine en strie. — Glaçure blanchâtre, demi-transparente. Pas de liquéfaction.

Pomme de terre. — Pas de culture apparente.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES. — TOXINES. — SIÈGE.

Vitalité. — L'Entérocoque est généralement très résistant dans les cultures; il y demeure vivant pendant plusieurs mois.

Toxines. — Les cultures filtrées (Thiercelin) ou stérilisées par ébullition (Rosenthal et Chazarain-Wetzel) tuent le lapin par cachexie subaiguë. Les cultures bouillies de certains échantillons sont pathogènes pour la souris par injection et par ingestion (Sacquépée).

Siège. — L'Entérocoque est un saprophyte normal des voies digestives, de la bouche. Il se rencontre en outre dans les organes ou tissus au cours de diverses infections (Voy. *Action pathogène*).

ACTION PATHOGÈNE.

Dans les conditions naturelles. — Chez l'homme. — Les manifestations pathologiques de l'Entérocoque sont diverses. Il provoque souvent des entérites chez l'enfant et chez l'adulte (Thiercelin), parfois des empoisonnements alimentaires (Sacquépée). Rosenthal lui attribue une forme traînante de bronchopneumonie. Thiercelin et Rosenthal l'ont également décelé dans certaines méningites suppurées. Le microbe décrit sous le nom de « Streptocoque de Bonome », fréquemment rencontré dans les méningites (p. 312), nous paraît à peu près identique à l'Entérocoque.

Il existe également des septicémies à Entérocoques (Trastour). Triboulet et Coyon ont souvent rencontré dans le sang, au cours du rhumatisme articulaire aigu, un microbe qui ressemble beaucoup à l'Entérocoque.

L'Entérocoque est parfois agent d'infection secondaire au cours de la tuberculose, des infections paratyphoïdes, etc. On le rencontre fréquemment dans les plaies de guerre.

Inoculation à l'animal. — Virulence. — La virulence de l'Entérocoque est variable. On peut augmenter la virulence par passages : inoculer sous la peau du lapin, de manière à produire un abcès : inoculer ensuite le pus à la souris : elle succombe; inoculer le sang à d'autres souris (Thiercelin).

La *souris* est l'animal le plus réceptif. Inoculée sous la peau avec un microbe virulent, elle succombe en vingt-quatre à quarante-huit heures; l'Entérocoque est abondant dans les organes et le sang.

Certains échantillons sont également pathogènes par ingestion.

Le *lapin* est moins sensible. Des échantillons très virulents tuent par septicémie. Moins virulents, ils provoquent un abcès local; l'animal meurt ensuite cachectique après plusieurs semaines.

Le *cobaye* est peu sensible.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic est basé sur la constatation du microbe.

Recherche du microbe. — Dans les produits pathologiques (sérosité, pus), on procédera tout d'abord à l'examen direct avec coloration au Gram. Cet examen est nécessaire, mais ne peut à lui seul donner que des présomptions assez grossières.

On cultivera ensuite, de préférence sur gélose ordinaire, de manière à obtenir des colonies séparées. On peut également cultiver d'emblée en bouillon et avec la culture développée, pratiquer un isolement sur gélose. Sur les colonies isolées, on procédera à l'identification du microbe : morphologie, caractères de culture, inoculation à la souris.

Pour les selles, Thiercelin indique le procédé suivant : ensemencer en bouillon anaérobie une trace de matières fécales; l'Entérocoque y prend le dessus dans les premières heures. Après vingt-quatre heures, prélever un peu de culture, procéder à des isolements sur gélose inclinée.

On différenciera des microbes voisins (Pneumocoque et Streptocoque) par le polymorphisme, la facilité de culture sur gélatine, la grande vitalité sur milieux ordinaires.

STREPTOCOQUE DE BONOME.

Avant que le Méningocoque ne fût bien connu, on a considéré pendant quelque temps le Streptocoque de Bonome comme l'agent le plus ordinaire de la méningite cérébro-spinale. Il est aujourd'hui bien déchu de ce rôle usurpé.

Le Streptocoque de Bonome nous paraît être singulièrement voisin de l'Entérocoque : aspect en courtes chaînettes capsulées dans l'organisme (pus méningé, animaux inoculés); chaînettes enchevêtrées en sérum de lapin (Bezançon et Griffon).

Les caractères de culture sont ceux de l'Entérocoque : même électivité pour la souris, pour le lapin, même inactivité à l'égard du cobaye ; même vitalité (Bonome, Chantemesse). Après passages successifs par le rat blanc, ce microbe reprend l'aspect diplococcique du Pneumocoque (Netter), aspect qui est également celui de l'Entérocoque dans l'organisme.

CHAPITRE XXII

MÉNINGOCOQUE

Le caractère de spécificité ne fut attribué qu'après de multiples controverses au coccus que Weichselbaum découvrit, en 1886, dans le pus cérébro-méningé de sujets morts de méningite cérébro-spinale. Weichselbaum l'avait désigné sous le nom de *Diplococcus intracellularis meningitidis*. L'usage a consacré le terme de « Méningocoque » qui lui a été donné dans la suite.

Cependant, à la suite de nombreuses recherches ayant eu pour but de distinguer ce germe des bactéries similaires, une notion nouvelle de la plus haute importance prit naissance; on reconnut que la « méningococcie » relevait de l'action pathogène, non d'un seul Méningocoque, mais de *plusieurs Méningocoques*.

Quelques mots d'historique sont nécessaires pour faire saisir la genèse de la dissociation qui a été ainsi opérée.

HISTORIQUE.

En 1909, Dopter a montré que dans le rhino-pharynx de certains sujets sains, comme aussi dans le liquide céphalo-rachidien de sujets atteints de méningite cérébro-spinale, on pouvait être appelé à constater la présence de germes paraissant identiques au Méningocoque, par leur aspect morphologique, leurs caractères de culture et leur action fermentative sur les sucres. Ils s'en séparaient toutefois par leurs caractères d'agglutination et de précipitation vis-à-vis du sérum antiméningococcique. Différents des pseudo-Méningocoques et du Méningocoque connus jusqu'alors, ils semblaient mériter le nom de *Paraméningocoques*. Ces constatations furent confirmées par un certain nombre d'auteurs, tant en France qu'à l'étranger.

Dans la suite, Dopter fut appelé à observer entre les divers échantillons de Paraméningocoques, des différences biologiques essentielles qui l'amenèrent à envisager la *pluralité* de ces germes. Cette

conception prit définitivement corps à la suite de ses recherches avec Pauron, si bien qu'il devint nécessaire de décrire trois types de Paraméningocoques, doués de spécificités respectivement différentes, qu'ils désignèrent sous les noms de Paraméningocoques α, β et γ.

Cette pluralité fut confirmée pendant la guerre par Gordon, Ellis, Arkwright, etc. ; il arriva même que les atteintes produites par ces germes se multiplièrent et devinrent aussi fréquentes que celles dues au Méningocoque type.

C'est alors que M. Nicolle, Debains et Jouan, ayant repris cette étude, retrouvèrent ces bactéries avec les réactions propres à chacune d'elles; mais ils modifièrent les appellations acceptées par tous, et, les englobant sous le même vocable de « Méningocoques » préférèrent les désigner sous les étiquettes de Méningocoques A, B, C et D, le Méningocoque A répondant au Méningocoque type, le B au Paraméningocoque α, le C au Paraméningocoque β, le D au Paraméningocoque γ.

Ces appellations sont actuellement consacrées par l'usage. Il convient de les maintenir, sous peine de troubler à nouveau l'esprit des bactériologistes et des cliniciens ; ce sont celles qui seront adoptées pour la description de ces germes.

CARACTÈRES COMMUNS A TOUS LES MÉNINGOCOQUES.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — Les Méningocoques doivent être étudiés dans les produits pathologiques et les cultures :

Dans le *pus céphalo-rachidien* recueilli pendant la vie ou sur le cadavre, ils se présentent sous la forme de cocci isolés sphériques, ou bien sous l'aspect de diplocoques, dont chaque élément revêtant la forme d'un *grain de café* est aplati sur la face qui regarde l'élément opposé. Parfois ils se disposent en tétrades, mais jamais en chaînettes.

Les Méningocoques se trouvent le plus souvent *inclus dans les éléments cellulaires* (fig. 150). Ceux-ci peuvent, en certains cas, en être littéralement bourrés, et l'aspect microscopique des préparations rappelle trait pour trait celui des lames de pus blennorragique. En général cependant, ils ne sont pas très nombreux, et, contrairement aux figures des classiques qui les montrent en grande abon-

dance, c'est à peine si, dans un champ de préparation, on peut déceler un ou deux globules pyoïdes contenant deux à trois éléments microbiens; souvent, même, on est obligé de parcourir plusieurs champs avant d'en trouver de semblables.

Dans les cellules de pus, ces cocci sont parfois entourés d'une auréole incolore; ce n'est pas une capsule, mais simplement une auréole de digestion due à la phagocytose.

Dans un certain nombre de cas, ils sont perceptibles non seule-

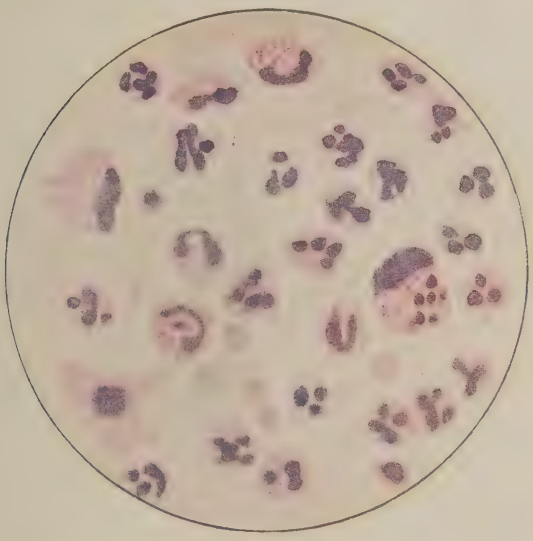

Fig. 150. — Liquide céphalo-rachidien dans la méningite cérébro-spinale méningococcique (coloration par le Gram et fuchsine diluée). Leucocytes pyoïdes. Méningocoques intracellulaires n'ayant pas pris le Gram.

ment dans l'intérieur de globules de pus, mais encore dans leur intervalle; parfois même (il s'agit alors le plus souvent de cas graves), ils sont exclusivement extracellulaires (fig. 151).

Dans le *mucus rhino-pharyngé*, on observe les mêmes particularités concernant l'aspect morphologique et la situation intracellulaire.

Dans les *cultures* de première génération, obtenues par l'ensemencement direct du liquide céphalo-rachidien, les Méningocoques présentent, dans la même colonie, des variations morphologiques importantes. A côté de cocci isolés, de diplocoques et de tétrades assez nombreux, présentant des dimensions moyennes, il existe de

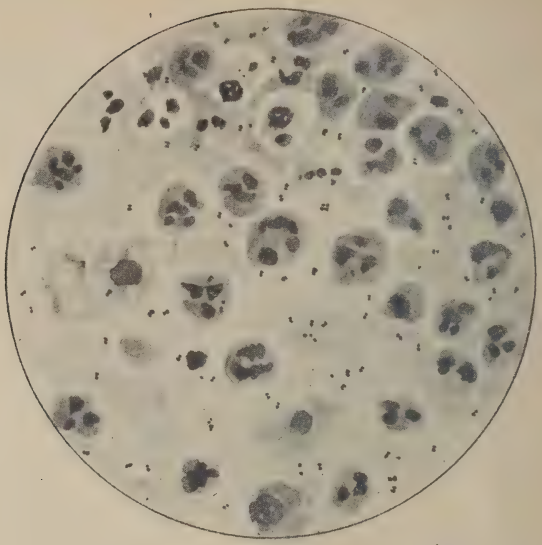

Fig. 151. — Liquide céphalo-rachidien de méningite cérébro-spinale grave (germes du type B extracellulaires).

Fig. 152. — Méningocoque. Culture sur gélose-ascite âgée de vingt-quatre heurs. Première génération.

véritables *formes géantes* (fig. 152), attribuées à des formes d'involution et retenant la coloration plus fortement que les précédentes.

Les cultures ayant subi plusieurs passages deviennent plus résistantes ; les cocci, diplocoques, etc., présentent alors des dimensions plus égales entre elles.

Colorabilité. — Les Méningocoques se colorent bien par toutes les couleurs d'aniline ; le bleu phéniqué, la thionine phéniquée sont les colorants de choix, surtout dans les produits pathologiques. *Ils ne prennent pas le Gram.* Les auteurs qui ont émis un avis opposé ne se sont certainement pas trouvés en face de Méningocoques, qu'ils ont confondus avec le *Diplococcus crassus* (Pseudo-Méningocoque de Jaeger).

CULTURES.

Aérobies stricts, les Méningocoques éprouvent certaines difficultés à cultiver dans les milieux artificiels, surtout quand ils sont récemment issus de l'organisme. Ils exigent, au moins dans les premières générations, des milieux additionnés d'albumine, et de préférence d'albumine humaine. On emploie dans ce but le sérum de bœuf, de mouton, mais de préférence le liquide d'ascite ou de pleurésie. Après plusieurs passages, ils s'acclimatent assez aisément aux milieux usuels.

La température optima de culture est de 38° ; ils ne commencent à pousser qu'à 31° ; à moins de 24° ils meurent ; il en est de même à 41°, température cependant très voisine de la température optima. Les conditions de culture de ces germes sont donc très restreintes.

Bouillon-ascite. — En bouillon-ascite (3 parties de bouillon ordinaire pour 1 partie d'ascite), ils ne commencent à troubler le milieu que vers le cinquième ou sixième jour ; à la surface, se forme un voile mince, fragile, qui tombe au fond du tube.

En bouillon ordinaire, les cultures acclimatées présentent les mêmes caractères.

Bouillon à l'œuf (Besredka et Jupille). — Dans ce milieu les cultures sont riches et abondantes ; le trouble obtenu est rapide (vingt-quatre à quarante-huit heures) ; de plus la vitalité du germe se conserve durant cinquante à soixante jours.

Bouillon Martin glucosé (M. Nicolle, Debains et Jouan). — Culture abondante rappelant, au bout de vingt-quatre heures, les cultures de Bacille typhique de même âge en bouillon Martin. Le développement s'y continue pendant six jours et la vie du microbe persiste durant deux semaines. On le prépare de la façon suivante :

Faire digérer pendant sept à huit heures à 50° des estomacs de porc dégraissés et hachés, comme pour la préparation du bouillon Martin. L'eau est d'abord portée à 55°, on ajoute ensuite, par litre, 10 centimètres cubes d'HCl pur et, en agitant, 300 grammes de hachis d'estomac. Régler la température à 50°. Après sept à huit heures, monter jusqu'à 80-90°, pour détruire la pepsine et arrêter la digestion. La peptone ainsi obtenue se conserve pendant plusieurs semaines.

Pour fabriquer le milieu, rendre la peptone légèrement alcaline; précipiter à 120°. Filtrer sur papier mouillé; ajouter 2 grammes de glucose; stériliser vers 112 à 115°.

Gélose-ascite (gélose à 3 p. 100 : 3 parties; ascite : 1 partie). — Les colonies isolées sont rondes, un peu surélevées, et mesurent, au bout de vingt-quatre heures, 1 à 2 millimètres de diamètre; elles présentent une teinte grisâtre et sont presque transparentes; vers le troisième jour, elles sont plus opaques, et leur centre est foncé.

D'après Papin, Gaudin et Stévenin, les colonies présenteraient un aspect caractéristique dû à la présence en leur centre d'un fin pointillé qui, d'abord discret, augmente progressivement pour se montrer constitué au bout de quarante-huit heures par une série de petits traits noirs. Des recherches de contrôle montrent que ce pointillé n'est pas spécial aux colonies de Méningocoques.

Une parcelle de ces colonies transportée dans une goutte d'eau s'émulsionne facilement, et d'une façon homogène (caractère qui les distingue des colonies de certains pseudo-Méningocoques).

Quand les colonies sont confluentes, elles forment une strie assez abondante, grisâtre, sans caractère spécifique.

En **gélose-sang** (Bezançon et Griffon), elles présentent un aspect identique.

Gélose au placenta (Kutscher). — On la prépare comme suit :

On prépare 1 litre de bouillon en faisant macérer du placenta coupé en morceaux (500 grammes pour 1 litre d'eau). On ajoute :

Gélose	2,5	p. 100
Sel marin	0,5	—
Glucose	1	—
Peptone	2	—

A 3 volumes de cette gélose légèrement alcalinisée et stérilisée, on ajoute 1 volume de sérum de bœuf chauffé à 60° pendant une heure quatre jours de suite.

Gélose-albumine d'œuf (Sacquépée et Delater).

1° Verser 2 blancs d'œuf dans un verre à pied gradué. En agitant constamment, ajouter petit à petit 3 fois leur volume d'eau *distillée*. Une

fois le mélange obtenu, alcaliniser (0,5 centimètre cube de soude à 1/10 pour 100 centimètres cubes du mélange). Porter à l'autoclave à 115° pendant quinze minutes (2 blancs d'œuf donnent 200 à 210 centimètres cubes de solution).

Le blanc d'œuf ainsi traité ne précipite plus en présence de la gélose ordinaire, à condition que ce dernier milieu soit suffisamment alcalin. Éviter un excès de soude qui serait nuisible. Opérer alors de la façon suivante:

2° Préparer la gélose comme à l'ordinaire, mais à 3 p. 100.

3° Mélanger la solution de blanc d'œuf et la gélose à raison de 1 partie de blanc d'œuf pour 5 de gélose.

4° Répartir; stériliser à 112° pendant quinze minutes.

Gélose Martin-sérum (formolé). — M. Nicolle, Debains et Jouan utilisent pour l'isolement le mélange suivant:

A 500 centimètres cubes de sérum de cheval, ajouter 1 centimètre cube de formol du commerce. Mélanger. Après quelques instants, verser 1 centimètre cube d'ammoniaque pour neutraliser la formaldéhyde.

Étendre de 2 parties d'eau distillée.

Stériliser à l'autoclave à 110° pendant quinze minutes.

Mélanger ce liquide à de la gélose Martin (sérum formolé : 1/3 ; gélose Martin : 2/3).

Gélose T (p. 295). — Bon milieu où les Méningocoques poussent abondamment.

Sérum coagulé. — Colonies petites, plus opaques que sur gélose-ascite, assez adhérentes au milieu.

Gélatine. — Les Méningocoques ne poussent pas sur gélatine, puisqu'ils ne commencent à pulluler qu'à une température de 31°.

Pomme de terre. — Ils poussent à peine sur pomme de terre en formant un minime enduit grisâtre.

Lait. — Le lait n'est pas coagulé.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — *Résistance aux agents physiques.* — Les Méningocoques offrent une résistance très minime à l'influence nocive des milieux extérieurs.

Dans les cultures, ils sont très sensibles à la chaleur, au froid, à la dessiccation, à la lumière.

Ils succombent en deux minutes à 80°, en cinq minutes à 70°, en dix minutes à 60°. Les basses températures leur sont aussi funestes: à la température du laboratoire, ils périssent en deux à trois jours. Pour les conserver, il faut laisser les cultures à 37°, en tubes capuchonnés pour éviter la dessiccation; dans ces conditions, les Ménin-

gocoques peuvent rester vivants pendant quinze à vingt jours quand ils sont acclimatés aux milieux artificiels ; sinon ils succombent en trois à quatre jours, même dans les milieux très nutritifs.

Ils ne résistent que quatre à cinq jours à la glacière.

La dessiccation leur est funeste : exposés sur des étoffes ou du papier-filtre, les Méningocoques ne vivent pas plus de six heures à 37°, douze heures à 15°.

On ne possède que peu de notions sur leur résistance dans les produits muqueux rhino-pharyngés : il est fort vraisemblable qu'elle est moins faible, car les germes sont protégés contre les influences extérieures, notamment la dessiccation, par la gangue albuminoïde dans laquelle ils sont contenus. Néanmoins les faits épidémiologiques montrent qu'elle est encore minime et n'excède pas quarante-huit à soixante-douze heures.

Résistance aux agents chimiques. — D'une façon générale, les Méningocoques offrent peu de résistance aux antiseptiques. L'acide sulfurique à 1 p. 100, le sublimé à 1 p. 1000 et les autres antiseptiques usuels en ont rapidement raison. Il en est de même quand on les soumet à l'action des vapeurs de certaines essences : essence d'eucalyptus, de thym, de bergamote, d'origan ; de même pour l'éther, l'acide phénique, le goménol, le xylol, l'iode. Mais ils résistent davantage quand ils sont inclus dans des produits muqueux.

Fermentations sucrées. — L'action fermentative des Méningocoques sur les sucres est importante à connaître, car elle permet de les différencier des germes similaires, avec lesquels ils ont été longtemps confondus.

A quelque type qu'ils appartiennent (A, B, C, ou D), ils font en effet *fermenter la glucose et la maltose*, mais *laissent intacts les autres sucres, notamment la lévulose* (fig. 161, 162, 163).

On s'en rend compte par les cultures en milieux sucrés tournesolés et au neutral-roth (page 138).

SIÈGE DU MÉNINGOCOQUE DANS L'ORGANISME HUMAIN.

Pus cérébro-méningé. — Le Méningocoque est décelable dans le pus qui entoure la moelle et la substance cérébrale ; on le décèle aussi dans le liquide céphalo-rachidien, extrait par ponction lombaire, dans la paroi des ventricules, etc. D'aucuns l'ont rencontré dans les abcès intracérébraux qui prennent parfois naissance ; les foyers d'encéphalite non suppurés, par contre, en sont dépourvus.

Rhino-pharynx. — Avant de se localiser aux méninges, le

Méningocoque détermine, initialement, une rhino-pharyngite ; le mucus rhino-pharyngé des méningitiques est en effet riche en Méningocoques (fig. 153), au moins au début ; c'est au niveau de la muqueuse de l'espace sus et sous-choanal qu'ils se cantonnent de préférence. Ce germe y est constant dans toute atteinte méningococcique ; il disparaît parfois rapidement, mais, en d'autres circonstances, il persiste pendant toute la durée de la méningite et survit même à sa guérison. C'est l'existence indubitable de cette rhino-

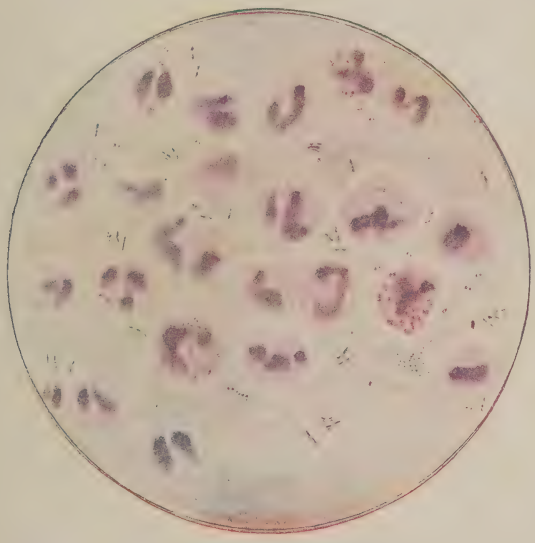

Fig. 153. — Méningocoques dans le mucus rhino-pharyngé : situation intracellulaire les autres formes appartiennent à la flore normale.

pharyngite qui a permis de comprendre la contagiosité de la méningite cérébro-spinale, et la façon dont s'opère sa propagation des malades à leur entourage.

Notion nouvelle de première importance, non seulement les méningitiques, mais les *sujets sains* ayant été en contact avec ces derniers peuvent porter dans leur rhino-pharynx le germe spécifique. Chez eux la présence du Méningocoque est liée à l'existence d'une rhino-pharyngite méningococcique, qui évolue seule, sans donner de complications méningées ; le coccus de Weichselbaum, chez ces porteurs sains, persiste en moyenne quinze jours ; certains faits, cependant, montrent qu'il peut durer plusieurs mois.

Circulation sanguine. — Le Méningocoque se retrouve encore dans la circulation sanguine, où on peut le déceler par l'hémoculture. Il provoque ainsi une septicémie méningococcique, qui se révèle en général avant l'éclosion des phénomènes méningés. Elle peut se montrer sans que ces derniers apparaissent; il s'agit alors de méningococcémie sans méningite (Bovaird, Netter, etc.).

Enfin le Méningocoque provoque encore des arthrites, des pleurésies, des péricardites, des bronchopneumonies, où l'examen bactériologique permet de le mettre en évidence.

ACTION PATHOGÈNE EXPÉRIMENTALE.

Chez l'animal, le pouvoir pathogène des Méningocoques est assez limité et très irrégulier dans ses effets. Les animaux les plus sensibles sont le jeune cobaye de 150 à 200 grammes et la souris.

Cobaye. — L'**injection sous-cutanée**, même de fortes doses, reste toujours négative; il se forme parfois seulement un abcès au point d'inoculation.

L'**injection péritonéale** de 1 à 3 doses de culture sur agar, âgée de vingt-quatre heures, produit en général une péritonite purulente, mortelle en un ou deux jours. Quand la mort est rapide, le pus est séreux, louche, et contient peu de leucocytes, mais fourmille de Méningocoques. Si elle tarde, le pus est grisâtre, opaque, contient une foule de leucocytes polynucléaires, plus ou moins déformés, et habituellement peu de Méningocoques; ces derniers sont intracellulaires. Le plus souvent, le Méningocoque n'envahit pas la circulation; on ne le décèle pas dans les viscères. En raison du petit nombre de germes contenus par ce pus, on estime en général que l'animal succombe par intoxication plutôt que par infection.

L'*injection intra-veineuse* tue l'animal, mais sans provoquer de septicémie ; il succombe aussi par intoxication.

Les injections *intrarachidiennes* ne donnent aucun résultat appréciable ; l'animal succombe, mais sans formation de pus dans les méninges.

Souris. — Les résultats sont à peu près semblables ; l'**injection intrapéritonéale** provoque aussi une péritonite suppurée où les Méningocoques sont décelables. L'injection intrapleurale produit une pleurésie purulente.

Variabilité de la virulence. — La virulence présente des variations énormes suivant l'échantillon qu'on utilise. Il en est de même quand on injecte des cultures du même échantillon à plusieurs cobayes de même poids et de même âge. Certains cobayes

succombent avec une dose minime; d'autres résistent avec une dose dix fois inférieure.

Méningite cérébro-spinale expérimentale. — V. Lingelsheim et Leuchs, puis Flexner ont réalisé une véritable méningite méningococcique expérimentale en injectant aux singes macaques des cultures de Méningocoques dans la cavité rachidienne. A l'aide de fortes doses, l'animal succombe en quelques heures; il est préférable d'opérer à des doses plus faibles, permettant une certaine survie; la méningite qui se développe est alors anatomiquement et bactériologiquement superposable à celle de l'homme. On trouve en effet à l'autopsie les méninges fortement congestionnées et infiltrées; les ventricules et l'épendyme sont dilatés; le tout baigne dans une sérosité louche qui contient de nombreux polynucléaires et des Méningocoques intracellulaires. En certains cas, Flexner a pu voir se développer des hydrocéphalies, comme en pathologie humaine, à la suite de l'obturation du trou de Magendie.

Enfin, fait intéressant, on a trouvé chez les singes ainsi inoculés le Méningocoque dans le mucus nasal.

TOXINE.

Le fait que le cobaye injecté dans le péritoine meurt plutôt d'intoxication que d'infection implique l'idée que le Méningocoque contient une toxine qui diffuse dans l'organisme. On est assez mal renseigné sur la nature de ce poison méningococcique.

On peut le mettre en évidence par les procédés suivants:

1° On racle une culture sur agar en boîte de Roux, âgée de vingt-quatre heures; on l'émulsionne dans 20 centimètres cubes d'eau distillée. L'émulsion est abandonnée à la température du laboratoire à l'obscurité, pendant quarante-huit heures, ou bien encore soumise à l'agitation mécanique. On centrifuge pour séparer du liquide les germes en suspension.

Un quart et même un dixième de centimètre cube du liquide injecté dans le péritoine d'un cobaye de 150 à 160 grammes le tue en douze ou vingt-quatre heures.

Kraus et Dœrr, pour assurer davantage la dissolution des microbes, remplacent l'eau distillée par une solution de carbonate de soude à un dixième; il ajoutent de plus du toluol, qu'ils évaporent ensuite, pour la stérilisation du liquide.

2° Dessécher dans le vide le produit de raclage d'une culture en boîte de Roux; en prélever 5 milligrammes qu'on triture dans un mortier jusqu'à obtention d'une poudre impalpable.

Ajouter 0gr,08 de sel marin. Triturer à nouveau. Verser petit à petit 10 centimètres cubes d'eau distillée stérile pour ramener la solution salée à la teneur de l'eau physiologique.

Abandonner pendant vingt-quatre heures à la température du laboratoire l'émulsion ainsi obtenue. Centrifuger.

Ce procédé, calqué sur celui que Besredka a fait connaître pour l'obtention des endotoxines en général, donne un produit toxique aussi actif que le précédent.

3° Le procédé de Gordon se rapproche beaucoup de ce dernier.

Broyer dans un mortier d'agate 1 décigramme de corps microbiens desséchés avec un poids égal de sable; émulsionner peu à peu dans 5 centimètres cubes d'eau distillée; laisser reposer une nuit à la glacière et centrifuger. Le liquide surnageant est desséché dans le vide.

Le produit ainsi obtenu tue la souris à la dose de 2 à 10 milligrammes.

4° Von Lingelsheim et Leuchs ont décelé la toxine dans les vieilles cultures en bouillon âgées de cinq semaines. Le liquide filtré était injecté sous la peau des souris: 1 centimètre cube suffisait à les tuer en vingt-quatre heures.

Ces faits sont de nature à montrer qu'il ne s'agit pas d'une toxine soluble, mais d'un poison retenu par le corps microbien.

CARACTÈRES SPÉCIAUX A CHACUNE DES VARIÉTÉS A, B, C, D DE MÉNINGOCOQUES.

L'expérience montre que chacune des variétés actuellement connues A, B, C et D de Méningocoques constitue un antigène se séparant des antigènes voisins par la propriété d'engendrer des anticorps différents, n'agissant spécifiquement que vis-à-vis de l'antigène homologue. C'est d'ailleurs par la mise en évidence de ces réactions étroitement spécifiques que leur distinction a pu être effectuée (Dopter et Pauron).

AGGLUTINATION.

1. **Technique.** — Dans trois tubes à essai, on verse 1 centimètre cube d'une dilution de sérum antiméningococcique *non chauffé* à 1 p. 100, 1 centimètre cube de sérum de cheval normal à p. 100; enfin 1 centimètre cube d'eau physiologique à 7 5 p. 1 000; on émulsionne dans chacun une öse de culture de Meningocoque âgée de vingt-quatre heures. On met à l'étuve à 37° et, au bout de quelques heures on observe: alors que dans des tubes témoins contenant l'un du sérum normal, l'autre de l'eau physiologique, l'émulsion a conservé son trouble homogène, dans

le tube en expérience des grumeaux se sont formés et amassés au fond du tube (fig. 154) : une légère secousse imprimée à ce dernier les fait percevoir aisément.

Pour rendre l'observation plus facile, il est préférable de pencher les tubes très obliquement (fig. 155) et de regarder vers la partie supérieure d'une fenêtre. Cette technique est très utile pour distinguer les agglutinations vraies des fausses agglutinations, qui se produisent parfois avec les germes similaires. Il arrive que ces derniers, en effet se déposent seulement au fond du tube sans s'agglutiner.

Il est souvent utile de mesurer le taux de l'agglutination. Dans ce but on prépare une série de tubes dans lesquels on verse 9/10 de centimètre cube d'une émulsion préparée avec une culture sur gélose diluée dans de l'eau physiologique. On ajoute alors 1/10 de centimètre cube de dilution de sérum calculée de façon à obtenir des taux variables d'agglutination : 1/50, 1/100, 1/200, etc.

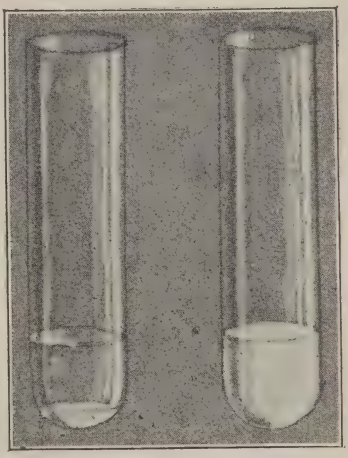

Fig. 154. — Agglutination des Méningocoques. Tube de droite : tube témoin (trouble homogène). Tube de gauche : tube contenant l'antisérum. Le dépôt est constitué par des amas microbiens.

Kutscher a montré que certains Méningocoques, inagglutinables

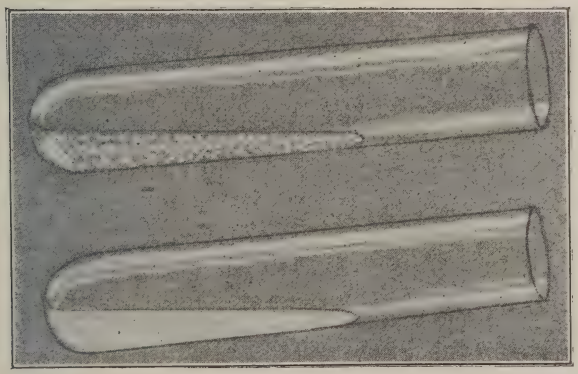

Fig. 155. — Agglutination. Les tubes sont penchés obliquement pour mieux percevoir les amas.

à 37°, s'agglutinent à 55°. Par contre, Dopter a rencontré plu-

sieurs échantillons agglutinables à 37° et inagglutinables à 55°.

II. Agglutination spécifique de chaque variété particulière de Méningocoques. — C'est là le caractère capital qui permet de distinguer entre elles les différentes races de Méningocoques (Dopter et Pauron).

Voici ce que montre l'expérience :

1° Le Méningocoque A et ceux du même type sont agglutinés spécifiquement par un sérum anti-A ; la réaction est négative avec les sérums anti-B, C et D.

2° Le Méningocoque B et ceux du même type sont agglutinés spécifiquement par un sérum anti-B ; mis en présence des sérums anti-A, C et D, ils ne subissent pas ce phénomène.

3° et 4° Mêmes remarques en ce qui concerne les Méningocoques C et D vis-à-vis de leurs sérums respectivement homologues et des sérums hétérologues.

Ces résultats s'appliquent également à l'agglutination recherchée avec le sérum des malades : le sérum d'un sujet infecté par le Méningocoque A sera, au bout du premier septénaire, agglutinant uniquement pour le type A; l'agglutination sera nulle pour les autres germes.

Telle est la règle générale. Il faut savoir toutefois qu'il existe des exceptions ; ces dernières ne sont qu'apparentes et sont dues à la présence assez fréquente, dans les antisérums, de coagglutinines qui n'ont aucun caractère spécifique.

Ces coagglutinations ne se produisent qu'avec les sérums expérimentaux.

Coagglutinations. — L'existence des coagglutinations est de nature à troubler l'interprétation d'une épreuve d'agglutination ; en effet :

Un sérum anti-A qui agglutine le type A peut agglutiner B, C ou D, ou tous les trois.

Il en est de même des autres antisérums et plus particulièrement pour le sérum anti-B.

En général, en pareil cas, l'agglutination homologue se révèle plus rapidement et à un taux plus élevé que la coagglutination ; ainsi un sérum anti-B agglutinera le type B à 1 p. 500, alors qu'il n'agglutinera A, C et D qu'à 1/50 ou 1/100. Il peut arriver cependant qu'agglutination et coagglutination se montrent à un taux sensiblement égal et apparaissent en même temps.

Quoi qu'il en soit, l'épreuve de la *saturation des agglutinines* permet de définir la véritable nature des unes et des autres et de les séparer pour les besoins de la pratique ; elle montre nettement que

les agglutinations homologues sont spécifiques ; les coagglutinations sont des agglutinations de groupe.

Cette épreuve permet encore de différencier les Méningocoques de certains pseudo-Méningocoques qui peuvent être agglutinés parfois par les sérums antiméningococciques.

PRÉCIPITATION.

On racle une culture de Méningocoques sur agar dans de l'eau physiologique ; on abandonne l'émulsion obtenue pendant vingt-quatre heures à la température du laboratoire, puis on centrifuge. Dans un tube de verre on verse XX gouttes du liquide clair obtenu (extrait autolytique) et 1 goutte de sérum antiméningococcique non chauffé, correspondant au Méningocoque qui a fourni l'extrait. Il se forme immédiatement un précipité abondant, qui se dépose dans la suite au fond du tube.

Les caractères de la précipitation sont calqués sur ceux de l'agglutination.

A côté des précipités spécifiques qui se manifestent avec un extrait et l'antisérum homologue, il peut se produire, bien qu'à un degré moindre, des co-précipitations avec les anti-sérums hétérologues.

L'épreuve de la *saturation des co-précipitines* contenues dans ces anti-sérums permet d'assigner aux précipitations homologues un caractère spécifique, que ne possèdent pas les co-précipitations (Dopter).

Mêmes remarques que précédemment pour les précipités qu'on observe avec les pseudo-Méningocoques et le Gonocoque.

BACTÉRIOLYSE.

La bactériolyse des Méningocoques peut être mise en évidence par trois procédés :

1° **Épreuve de Bordet-Gengou** (fixation du complément). Elle s'effectue en prenant comme antigène soit l'extrait autolytique des cultures de Méningocoques (Kolle et Wassermann), soit les cultures elles-mêmes, vivantes ou tuées (Krumhein et Schatiloff, Dopter, etc.).

Réactions des Méningocoques en général. — L'expérience montre que :

1° Les Méningocoques fixent le complément en présence des sérums antiméningococciques.

2° La fixation est nulle en présence de sérum normal ou des

antisérums divers à la préparation desquels le Méningocoque est étranger.

3° Elle est encore nulle quand les pseudo-Méningocoques sont mis en présence des sérums antiméningococciques.

Par conséquent, la bactériolyse mise en évidence par ce procédé est spécifique pour tout le groupe des Méningocoques.

Réactions des diverses variétés de Méningocoques. — Mis en présence d'un sérum anti-A, non seulement le type A, mais aussi les types B, C et D donnent la réaction de fixation. Il en est de même quand, au lieu du sérum anti-A, on utilise les sérums anti-B, C et D.

Chaque type de Méningocoque subit donc indistinctement l'action bactériolytique à la fois du sérum homologue et des sérums hétérologues.

Existe-t-il ici une bactériolyse spécifique et une co-bactériolyse? C'est vers cette pensée qu'on est orienté *a priori*, par analogie avec ce que l'on sait de l'agglutination et de la précipitation. D'ailleurs, d'après les essais quantitatifs de M. Nicolle, Debains et Jouan, la bactériolyse des germes hétérologues, tout en se rapprochant de la bactériolyse homologue, se montre en général inférieure à cette dernière. L'épreuve de la saturation n'a pas encore permis de résoudre le problème.

Toutefois, on peut, par une voie indirecte, se faire une idée de la nature de la lyse qui s'opère dans ces divers cas: quand on recherche en effet la fixation du complément, non plus avec des antisérums expérimentaux, mais avec du sérum de malades, on constate que le Méningocoque A, par exemple, fixe le complément en présence du sérum de sujets infectés par ce type, alors que la réaction reste nulle avec le sérum de sujets infectés par B, C ou D. Constatations analogues si ces derniers sont pris comme antigènes avec leurs sérums correspondants.

La lyse microbienne révélée par l'épreuve de Bordet-Gengou est donc vraisemblablement spécifique pour les germes et sérums homologues; celle qui se manifeste entre germes et sérums hétérologues serait une réaction de groupe, non spécifique.

2° **Épreuve du péritoine** (Dopter). — A une série de cobayes on injecte dans le péritoine 0,5 centimètre cube de sérum normal, 0,5 centimètre cube de sérum anti-A; vingt-quatre heures après, 1 centimètre cube d'une culture du type A sur agar émulsionnée dans 6 centimètres cubes d'eau physiologique. On prélève l'exsudat péritonéal de cinq en cinq minutes, on l'étale sur lame et, après coloration à la thionine phéniquée, on examine au microscope.

Chez les cobayes témoins n'ayant reçu que l'*émulsion microbienne*

seule, on constate, pendant plusieurs heures après l'inoculation, une foule innombrable de Méningocoques ; les leucocytes ne commencent

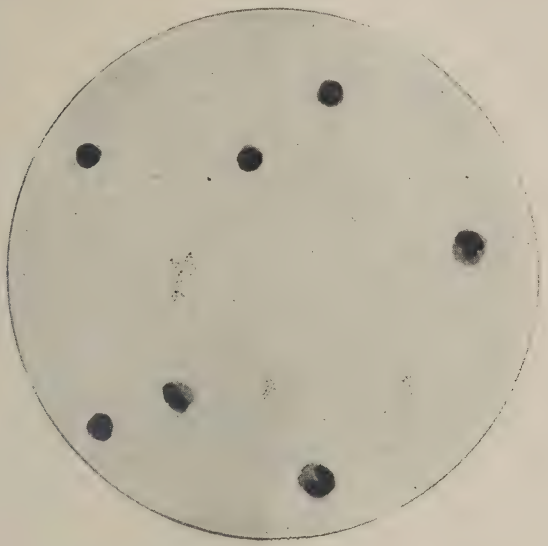

Fig. 155. — Épreuve du péritoine avec sérum anti-A et Méningocoque A. Bactériolyse des Méningocoques injectés.

à arriver que vers la sixième heure : à ce moment, les Méningocoques diminuent progressivement de nombre pour disparaître ensuite vers la dixième heure.

Chez les animaux qui ont reçu préalablement du *sérum normal*, l'évolution est plus rapide ; la leucocytose apparaît vers la deuxième ou troisième heure, et les Méningocoques, très nombreux jusqu'alors, disparaissent.

Chez ceux qui ont été injectés avec le *sérum antiméningococcique*, on est frappé de voir qu'après une phagolyse intense qui ne dure que cinq à huit minutes, l'hypoleucocytose est la règle, et les Méningocoques subissent une fonte progressive, en même temps qu'une phagocytose intense s'exerce au niveau de l'épiploon ; mais, fait essentiel, vingt minutes après l'injection microbienne, l'examen ne montre que quelques lymphocytes, et la disparition des germes est complète (fig. 156).

Il est difficile de montrer d'une façon plus saisissante l'action nocive de l'antisérum sur le Méningocoque utilisé. Il l'exerce par

son pouvoir excito-phagocytaire, mais aussi par son pouvoir bactériolytique. Il est infiniment vraisemblable que ce dernier n'est mis en œuvre qu'indirectement à la faveur de la phagolyse. Metchnikoff a démontré, en effet, que dans le phénomène de Pfeiffer, qui est en réalité reproduit ici pour le Méningocoque, la destruction extracellulaire des bactéries « se présente comme la manifestation bactéricide du liquide issu des leucocytes atteints ou désagrégés pendant la phase de phagolyse ». Quoi qu'il en soit d'ailleurs de l'interprétation donnée du phénomène, la fonte et la disparition du germe injecté relèvent finalement de la bactériolyse.

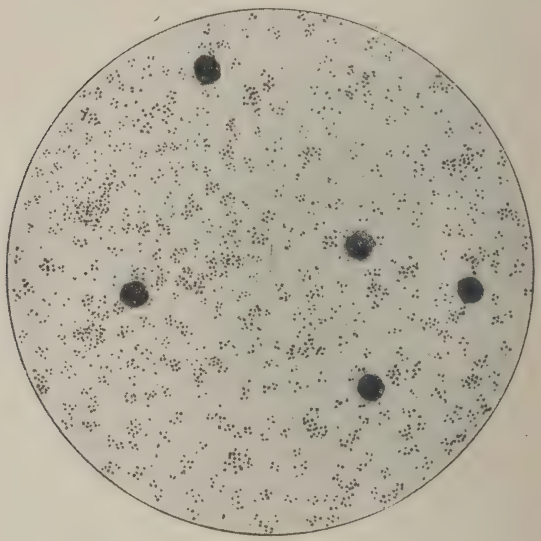

Fig. 157. — Épreuve du péritoine avec sérum anti-A et Méningocoque B. Abondance et intégrité des germes.

L'expérience montre en outre que la plupart du temps, cette bactériolyse se manifeste avec un caractère spécifique, car, réalisée avec un sérum anti A et le type A, elle n'apparaît pas si ce dernier est remplacé par les types B, C et D (fig. 157).

Même règle quand on met ces derniers en présence de leurs germes correspondants.

Ici encore, par conséquent, la spécificité « de type » est indiscutable; néanmoins on observe parfois, comme dans les épreuves précédentes, des co-réactions.

L'épreuve de la *saturation* montre que la lyse homologue est seule spécifique, la lyse hétérologue n'est qu'une bactériolyse de groupe, une co-bactériolyse.

3° **Épreuve de la veine** (Briot et Dopter). — Cette épreuve complète les données précédentes :

Quand on injecte dans la veine jugulaire d'un cobaye de 250 à 300 grammes un mélange de sérum antiméningococcique non chauffé (1 centimètre cube) et d'une émulsion de Méningocoques de type correspondant (1cc,5), on détermine chez l'animal des troubles immédiats rappelant le syndrome anaphylactique, et pouvant se terminer par la mort quelques minutes après l'injection. Ces troubles relèvent, à n'en pas douter, d'une lyse microbienne qui s'est effectuée sous l'influence du sérum qui, détruisant les germes, a mis en liberté une substance mortelle non neutralisée par ce sérum.

De plus, cette bactériolyse est en général strictement spécifique pour un type de Méningocoque et son antisérum correspondant ; elle est nulle (ou presque) pour les germes hétérologues. Donc, ici encore, même notion de bactériolyse spécifique et de co-bactériolyse, confirmée d'ailleurs par le résultat de la saturation dans les cas où la lyse s'exerce avec les germes ou les sérums hétérologues.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Il résulte de l'étude de ces divers phénomènes biologiques que le groupe des Méningocoques doit être dissocié en plusieurs types. Chacun d'eux se différencie des types voisins par une spécificité étroite qui l'individualise ; si celle-ci semble se démentir parfois en raison de l'existence des co-réactions, ce n'est qu'en apparence, les co-réactions ne pouvant se réclamer d'aucune spécificité.

D'ailleurs, il est un point capital à retenir au point de vue pratique : c'est l'échec thérapeutique absolu de la sérothérapie quand on n'emploie pas le sérum correspondant au type infectant : un sérum anti-A reste totalement inefficace dans un cas de méningococcie provoquée par les types B, C ou D ; de même un sérum anti-B dans les cas où les types voisins sont en cause, etc. L'importance que présente cette donnée, au point de vue de la thérapeutique à exercer dans un cas déterminé, n'est pas à souligner.

CARACTÈRES DISTINCTIFS DES PSEUDO-MÉNINGOCOQUES.

« **Micrococcus catarrhalis** ». — Hôte fréquent du rhino-pharynx et des voies respiratoires, le *Micrococcus catarrhalis*, isolé par

Pfeiffer, bien étudié par Bezançon et J. de Jong, provoque fréquemment des angines, parfois des méningites aiguës, semblables en tous points à la méningite méningococcique.

Les colonies sur gélose-ascite sont rondes, blanches; elles présentent une surface sèche et un peu inégale; à un faible grossissement, elles paraissent granuleuses et légèrement brunâtres. Leur diamètre dépasse rarement 1 millimètre à $1^{mm},5$; elles sont donc plus petites que celles du Méningocoque. Quand on cherche à les émulsionner dans une goutte d'eau, elles forment des grumeaux.

En tubes inclinés, la culture est blanche, compacte.

Au microscope, le *M. catarrhalis* apparaît sous l'aspect de microcoques isolés assez volumineux; sauf sur les cultures de première génération, on perçoit rarement des diplocoques, et plus exceptionnellement encore des tétrades. Il ne prend pas le Gram.

Il n'est pas agglutiné par le sérum antiméningococcique et ne fait fermenter aucun sucre.

« **Diplococcus pharyngis siccus** ». — Les colonies sont sèches, résistantes au prélèvement, profondément sillonnées ; elles mesurent environ 3 millimètres de diamètre. Il est impossible de les émulsionner en milieu liquide et de dissocier les grumeaux qui se forment alors.

Les éléments microbiens sont en général de petits diplocoques, tous égaux, ne prenant pas le Gram.

Ce germe fait fermenter tous les milieux sucrés. L'agglutination est impossible à chercher en raison de l'impossibilité d'émulsionner ses colonies.

« **Micrococcus pharyngis cinereus** ». — Colonies blanc grisâtre, arrondies, de 1 à $1^{mm},5$. A un faible grossissement, elles paraissent brunes, granuleuses, avec des bords lisses.

Ce germe pousse aisément sur gélose ordinaire et sur gélatine, ce que ne fait aucun des germes similaires.

Sur les préparations colorées (Gram négatif), on perçoit des cocci volumineux en diplocoques ou en amas séparés.

Agglutination négative. Fermentations négatives sur tous les sucres.

« **Diplococcus pharyngis flavus I** ». — Colonies rondes, peu élevées, transparentes, légèrement jaunâtres. Elles s'émulsionnent bien dans une goutte liquide qui prend une teinte jaune.

Elles poussent bien sur gélose ordinaire. Cocci ne prenant pas le Gram, identiques à ceux du Méningocoque. Tétrades rares.

Agglutination négative. Fait fermenter tous les sucres.

« **Diplococcus pharyngis flavus II** ». — Colonies analogues

à celles du *M catarrhalis*, mais teintées en jaune clair ; elles s'émulsionnent difficilement dans les liquides.

Cocci très petits ne prenant pas le Gram.

Agglutination négative. Fait fermenter tous les sucres.

« **Micrococcus pharyngis flavus III** ». — Colonies rondes peu élevées, transparentes, analogues à celles du Méningocoque, mais jaunâtres. Pousse très peu sur gélose ordinaire. La culture sur gélose-ascite est nettement jaune.

Cocci semblables à ceux du Méningocoque, mais sans tétrades. Gram négatif.

Agglutination en général négative. Ce germe agglutine parfois cependant avec l'antisérum et le sérum normal. Fait fermenter glucose et maltose, sans action sur la lévulose (comme le Méningocoque).

« **Diplococcus crassus** » ou **Pseudo-Méningocoque de Jæger.** — Colonies petites, gris blanc, granuleuses, ou bleu gris. En tubes inclinés, la culture est blanche, compacte, moins abondante que celle du Méningocoque. Pousse sur gélose ordinaire ; la culture commence à 20°.

Le *Diplococcus crassus prend le Gram* ; mais souvent sur la même préparation un certain nombre de cocci ne le prennent pas.

Les cocci sont plus volumineux que ceux du Méningocoque ; on observe, comme pour ce dernier, des différences de taille suivant les éléments.

Il agglutine parfois avec le sérum antiméningococcique ; l'épreuve de la saturation des agglutinines montre qu'il s'agit de coagglutinines.

Fait fermenter tous les sucres.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Recherche directe.

La recherche du Méningocoque s'effectue dans les différents produits pathologiques qui le renferment.

Dans le liquide céphalo-rachidien. — *Ponction lombaire.* — On pratique, suivant la technique usuelle, une ponction lombaire qui donne issue à du liquide céphalo-rachidien, louche et opalescent, ou clair et limpide.

Centrifugation. — Quel que soit son aspect, on soumet le liquide à la centrifugation pendant quinze à vingt minutes : un culot blanchâtre ou grisâtre se forme au fond du tube, alors que la partie liquide superficielle est claire et limpide.

Examen microscopique. — Après décantation, à l'aide d'une pipette effilée, on prélève une parcelle du culot, et on l'étale en couche mince sur plusieurs lames de verre.

Après dessiccation, fixer par l'alcool-éther, et colorer par la thionine phéniquée ou de préférence par la méthode de Gram, avec suraddition de fuchsine de Ziehl diluée.

Au microscope, outre des leucocytes dégénérés (polynucléaires le plus fréquemment), on constate des cocci en grains de café, ne prenant pas le Gram, intracellulaires ou extracellulaires. Ce seul examen ne permet pas de préjuger de leur nature : il peut s'agir de Méningocoques, comme aussi de germes similaires. L'isolement s'impose pour qu'on puisse, par des réactions biologiques, caractériser ce germe, suspect à l'examen direct.

Isolement. — Plusieurs procédés peuvent être employés :

1° Procédé classique (ancien). — Ensemencer abondamment en surface le culot de centrifugation, soit sur tube de gélose-ascite, soit sur boîte de Petri dans laquelle ce milieu a été préalablement coulé. A défaut de gélose-ascite, employer l'un des milieux albumineux qui ont été décrits (p. 318). On porte à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre-heures. Ce délai passé, prélever une parcelle des colonies qui ont poussé; on l'émulsionne dans une gouttelette d'eau versée sur une lame de verre. On fait ainsi une préparation que l'on colore par le Gram et le Ziehl surajouté.

Si la colonie examinée révèle la présence d'un coccus en grain de café, ne prenant pas le Gram, la repiquer sur un tube de gélose-ascite ; cette nouvelle culture permettra l'identification ultérieure (si la culture venant directement de l'ensemencement du liquide céphalo-rachidien est pure et assez abondante, on peut, pour gagner du temps, l'utiliser immédiatement pour l'identification).

Dans un certain nombre de cas, surtout quand le liquide céphalo-rachidien est examiné plusieurs heures après son prélèvement, ces moyens de recherche peuvent ne donner aucun renseignement : ou bien l'examen microscopique ne révèle l'existence d'aucune bactérie (faire néanmoins l'ensemencement), ou bien l'ensemencement reste stérile.

Enfin il arrive que, même si la recherche précédente a été poursuivie dans les conditions les plus favorables, les résultats restent néanmoins négatifs. La proportion de ces cas est encore assez élevée. Aussi, s'est-on ingénié, en maints laboratoires, à trouver un procédé donnant des résultats plus constants.

Procédé de Tribondeau. — Soit le liquide céphalo-rachidien (10 à 15 centimètres cubes environ). En prélever 5 à 10 centimètres cubes.

pour un ensemencement total ; réserver le reste qui sera soumis à la centrifugation en vue de l'examen microscopique et de la culture du culot.

a. *Culture totale* (Procédé de choix d'après l'auteur). — Couler de la gélose-ascite dans une grande boîte de Petri. Après solidification, verser sur ce milieu 5 à 10 centimètres cubes de liquide céphalo-rachidien venant d'être obtenu par ponction lombaire.

Placer la boîte à plat, dans l'étuve à 37°. Au bout de six heures environ, donner à la boîte de Petri un léger degré d'inclinaison, de manière que le liquide céphalo-rachidien se collecte dans la partie déclive en laissant à découvert plus de la moitié de la surface du milieu. Dès la seizième ou dix-huitième heure, on observe des colonies de Méningocoques disséminées dans toute la zone émergeante, et confluant souvent en bande le long de la limite du liquide.

Ce procédé paraît donner des résultats supérieurs à ceux de la méthode classique ; l'ensemencement est plus abondant, puis le liquide apporte à la culture un complément de substances nutritives.

b. *Culture du culot de centrifugation.* — Sur le culot de centrifugation, dont on a prélevé une parcelle en vue de l'examen microscopique direct, verser à la place du liquide surnageant qui a été décanté, 2 à 3 centimètres cubes de bouillon ordinaire (ou mieux bouillon-ascite, bouillon à l'œuf, bouillon Martin glucosé). Émulsionner le culot et placer à l'étuve à 37°.

Dès la seizième heure, le pus s'étant déposé au fond du tube, le liquide surnageant, resté clair ou devenu trouble, contient du Méningocoque en abondance.

D'après Tribondeau, d'une façon générale, ce procédé serait moins fidèle que le précédent. En certains cas cependant, il donne des résultats positifs alors que la culture totale en boîte de Petri est restée négative. Ensemencer alors sur tubes de gélose-ascite, la culture en bouillon qui a été fertilisée, les colonies obtenues devant servir à l'identification.

Procédé de M. Nicolle, Debains et Jouan. — Ces auteurs associent, pour le même ensemencement, deux méthodes :

a. La méthode classique, où la gélose-ascite est remplacée par la gélose-sérum (formolé).

b. La culture en masse en bouillon Martin glucosé. Ensemencer dans un tube contenant ce milieu (1/3 de liquide céphalo-rachidien pour 2/3 du milieu) ; incliner le tube dans l'étuve pour obtenir, par une bonne aération, la croissance rapide des germes.

Au bout de seize à dix-huit heures, la culture est assez abondante pour permettre l'identification.

Ce procédé présente toutefois l'inconvénient de favoriser la culture des souillures accidentelles, qui prennent alors le pas sur la culture du Méningocoque.

Dans le mucus rhino-pharyngé. — *Prélèvement* (fig. 158). — Le prélèvement doit être pratiqué non dans les fosses nasales, mais au niveau du rhino-pharynx. Faire ouvrir la bouche du sujet ; une spatule abaisse la langue ; de la main droite, introduire derrière le voile du palais un écouvillon (fig. 158, B, E) d'ouate stérile, monté sur tige de métal coudée. Imprimer alors à l'appareil quelques mouvements d'oscillation à droite et à gauche, et on le retire enduit de mucus.

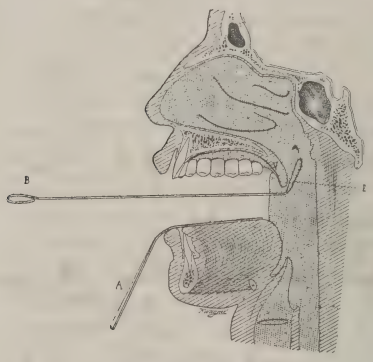

Fig. 158. — Prélèvement du mucus rhino-pharyngé dans le rhino-pharynx.

On peut pratiquer, à l'aide de ce mucus, un examen microscopique direct, mais les renseignements qu'il donne sont dénués de valeur. Il faut, sans plus attendre, effectuer l'isolement.

Isolement. — A la périphérie d'une boîte de Petri dans laquelle on a coulé de la gélose-ascite, on dépose une parcelle du mucus recueilli ; à l'aide d'une spatule, ou d'un agitateur coudé, on l'étale

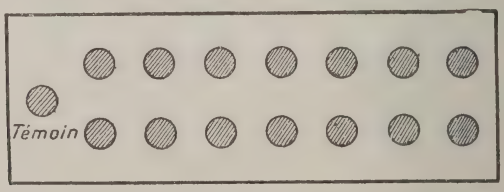

Fig. 159. — Dispositif pour l'examen de nombreuses colonies suspectes.

sur toute la surface, puis, au besoin, sur une deuxième et même une troisième boîte semblable de gélose-ascite, sans recharger l'öse. On met à l'étuve pendant vingt-quatre à quarante-huit heures, en ayant soin de placer les boîtes face en dessous, pour éviter l'humidification de la surface par l'eau de condensation.

Après ce délai, on observe habituellement de nombreuses colonies isolées. Porter l'attention sur les colonies rondes, transparentes, grisâtres, de 1 à 2 millimètres de diamètre (fig. 160).

On prélève une parcelle de plusieurs colonies suspectes ; on l'émulsionne dans une gouttelette d'eau déposée sur une lame de verre.

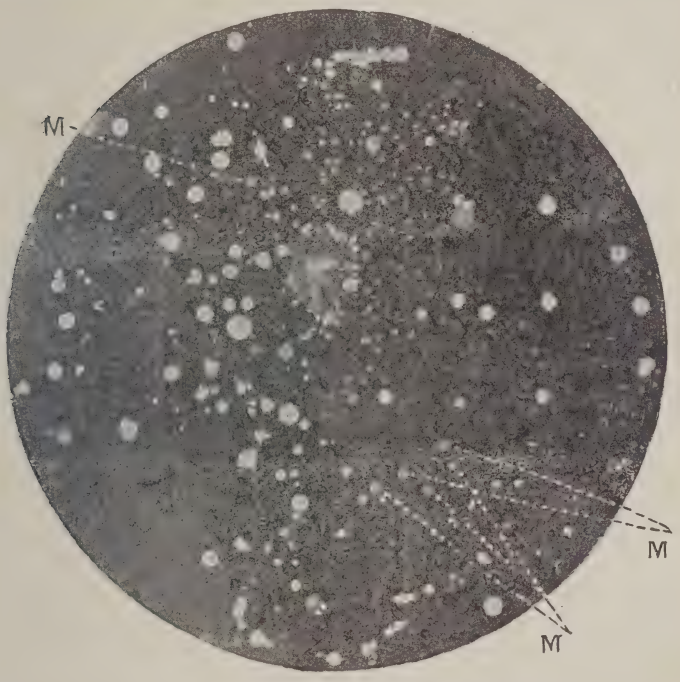

Fig. 160. — Boîte de Petri avec gélose-ascite ensemencée avec du mucus rhino-pharyngé. Au milieu de colonies diverses, on perçoit des colonies de Méningocoque, M, semi-transparentes (grandeur naturelle).

Si l'on a de nombreuses colonies à identifier, il est commode, pour gagner du temps, de faire sur la même lame de quinze à vingt préparations (fig. 159) d'égale épaisseur (1). (Il est bon d'y ajouter sur un coin une émulsion d'un microbe prenant le Gram, qui servira de témoin). Sécher, fixer, colorer par le Gram avec suraddition de Ziehl. Le microscope montre ensuite lesquelles parmi ces colonies

(1) Chaque préparation peut être étiquetée à l'aide du crayon gras par un numéro correspondant à celui qui a servi à repérer sur la boîte de Petri les colonies auxquelles elles se rapportent.

sont constituées par des cocci en grains de café, ne prenant pas le Gram : on ensemence ces dernières sur tubes de gélose-ascite, que l'on place à l'étuve pendant vingt-quatre heures, pour obtenir une culture destinée aux épreuves d'identification.

Dans le sang. — On pratique une hémoculture dans les conditions habituelles, et on ensemence 4 à 5 centimètres cubes de sang dans un ballon de 250 centimètres cubes de bouillon-ascite, ou de tout autre milieu favorable (bouillon à l'œuf, bouillon Martin glucosé). Quand la culture a été fertilisée, on pratique un isolement sur tubes de gélose-ascite, comme précédemment.

Dans les viscères. — Au niveau des viscères, le prélèvement est simple : il s'effectue comme pour la recherche microbienne dans toute maladie infectieuse.

Ce prélèvement, pratiqué au niveau de l'endocarde, du péricarde, du poumon, de la plèvre, des articulations, etc., est suivi d'examen microscopique direct, puis d'une mise en culture sur milieu solide (milieux signalés), en vue d'obtenir des colonies isolées, capables de permettre l'identification.

Identification.

Les recherches précédentes doivent être complétées par les épreuves d'identification ayant pour but de savoir :

1° Si le germe isolé est un Méningocoque :

2° A quel type de Méningocoque il appartient.

Les cultures obtenues après ensemencement des colonies reconnues suspectes doivent être soumises aux épreuves des fermentations sucrées et de l'agglutination.

Épreuves des fermentations sucrées. — Ensemencer sur l'un des milieux suivants :

Milieux tournesolés. — Procédé de Von Lingelsheim.

On prend 135 centimètres cubes d'un mélange de gélose à 3 p. 100, additionnée, à la température de 60°, de liquide d'ascite. On y ajoute 15 centimètres cubes de teinture de tournesol contenant 10 p. 100 de sucre : lévulose, glucose, maltose. On coule ces milieux sucrés encore liquides dans des boîtes de Petri, où ils se solidifient après refroidissement. On ensemence sur ces milieux une öse de culture (fig. 161, 162, 163).

Même procédé simplifié (Dopter).

Préparer de la gélose sucrée (lévulose, glucose, maltose) en ayant soin de la stériliser à 105° pendant 30 minutes pour éviter la caramélisation. Ajouter du liquide d'ascite dans les proportions habituelles (1/3 du vo-

lume total de gélose) et additionner de tournesol stérilisé dans la même proportion que ci-dessus, pour obtenir la teinte bleue désirée.

Préparer ainsi 3 boîtes de Petri (ou 3 tubes).

Après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve à 37°, on observe les résultats: si pas de fermentation, la culture qui a poussé reste bleue; si fermentation, elle prend une teinte rose.

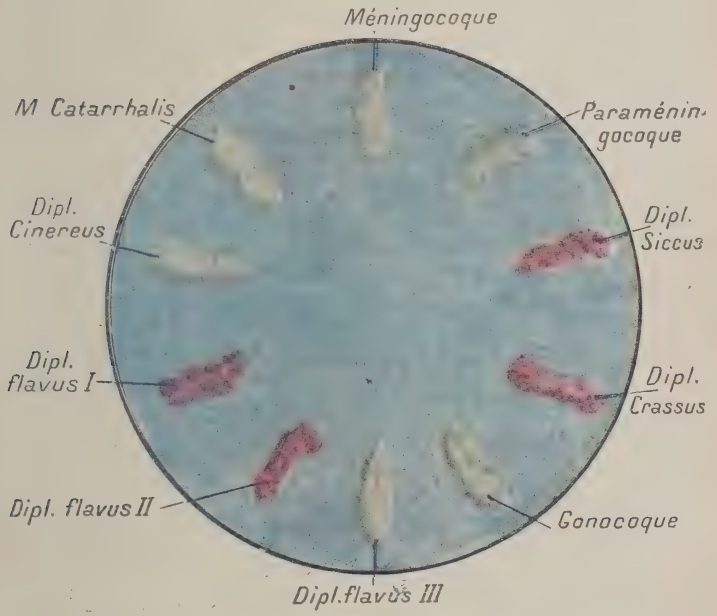

Fig. 161. — Épreuve des fermentations sucrées (Méningocoque et germes similaires). Gélose-ascite *lévulosée* tournesolée.

Il est prudent de surveiller les fermentations avant que le délai de vingt-quatre heures ne soit expiré. Il arrive parfois en effet (question de germes, question de qualité des sucres) que la fermentation soit assez précoce, mais transitoire. Un examen tardif risque, dans ces cas, de laisser passer inaperçue la fermentation qui s'est effectuée.

Procédé de Bruns et Hohn.

Mélanger, à parties égales, du bouillon ordinaire et du liquide ascitique. A 100 centimètres cubes du mélange, on ajoute:

1° 15 centimètres cubes de la solution sucrée à 10 p. 100; 2° 15 centimètres cubes de tournesol. On répartit en tubes stériles et on ensemence.

La culture étant plus longue à s'effectuer, les résultats sont plus tardifs.

Milieux au neutral-roth (Dopter et R. Koch).

Dans 75 centimètres cubes de gélose à 3 p. 100, on fait dissoudre 1 gramme de lévulose, dextrose, maltose. Après un séjour de vingt minutes à l'auto-

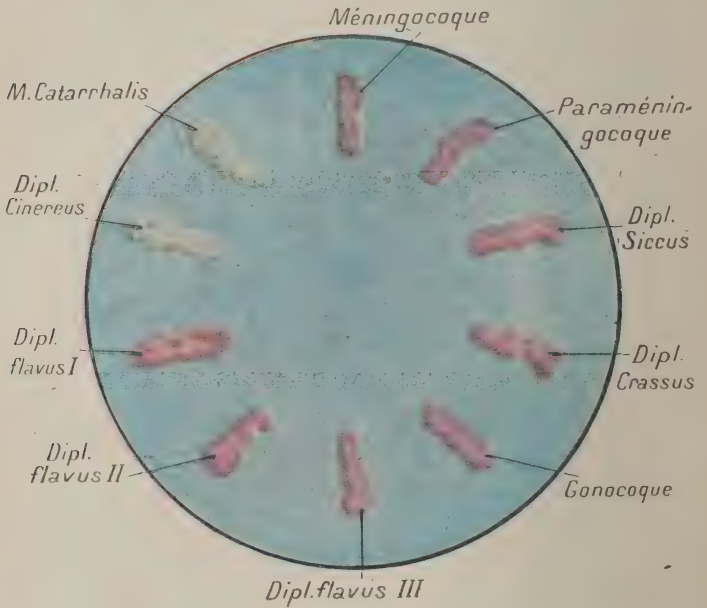

Fig. 162. — *Idem.* — Gélose-ascite *glucosée* tournesolée.

clave à 105°, on ajoute 25 centimètres cubes d'ascite et 1 centimètre cube d'une solution de neutral-roth à 1 p. 100. Le milieu prend une teinte orangée. On le maintient au bain-marie à 60° pendant une heure environ; au bout de ce temps, un précipité se forme. On agite les récipients, et l'on coule le milieu en boîtes de Petri; sous une faible épaisseur, il prend une teinte jaune.

Après ensemencement et séjour à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures, on observe: sur les milieux qui n'ont pas fermenté, la culture est jaunâtre comme le milieu; sur ceux qui ont subi la fermentation, la culture est rouge vif (groseille ou carmin).

MICROBES.	DEXTROSE.	LÉVULOSE.	GALACTOSE.	MANNITE.	DULCITE.	SACCHAROSE.	MALTOSE.	LACTOSE.	INULINE.
Méningocoques A,B,C,D..	+	0	0	0	0	0	+	0	0
Micrococcus catarrhalis..	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micrococcus cinerus.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diploc. phar. flav. I.....	+	+	0	0	0	0	+	0	0
Diploc. phar. flav. II.....	+	+	0	0	0	0	+	0	0
Diploc. phar. flav. III...	+	0	0	0	0	0	+	0	0
Diplococcus siccus.....	+	+	0	0	0	0	+	0	0
Diplococcus crassus.....	+	+	+	0	0	+	+	+	0
Gonocoque.....	+	0	0	0	0	0	0	0	0

Le tableau récapitulatif ci-dessus donne les résultats de ces fer-

Fig. 163. — *Idem.* — Gélose-ascite *maltosée* tournesolée.

mentations sucrées avec le Méningocoque et les divers germes qui s'en rapprochent.

Il est à remarquer que, seul des germes étrangers aux Méningocoques, le *Dipl. Flavus I*[1] présente des réactions sucrées identiques à ces derniers; mais la teinte jaune de la culture (observée surtout au moment du prélèvement avec l'anse de platine) écarte toute confusion.

Épreuve de l'agglutination. — 1° *Procédé extemporané* (M. Nicolle, Debains et Jouan).

D'une culture de dix-huit à vingt-quatre heures sur gélose-ascite du germe isolé du liquide céphalo-rachidien, prélever une anse de platine bien remplie (anse de 2 millimètres de diamètre), l'émulsionner dans 4 centimètres cubes d'eau physiologique.

La densité de cette émulsion correspond à celle obtenue par le mélange de 1 centigramme de corps microbiens dans 20 centimètres cubes d'eau.

Répartir l'émulsion dans 4 petits tubes à agglutination (tubes de 8 millimètres de diamètre) à raison de 1 centimètre cube par tube.

Ajouter au 1er tube 1/20 de cc. de sérum antiméningococcique A
— 2e — — B
— 3e — — C (1)
— 4e — de sérum normal de cheval.

On peut aussi compter 19 gouttes d'émulsion microbienne par tube où l'on ajoute une goutte, de même volume, de sérum.

Les tubes sont aussitôt bouchés par un tampon serré de coton cardé, agités dans le sens de la hauteur à plusieurs reprises afin de hâter l'agglutination.

En cas de résultat positif, cette agglutination est perceptible *à la loupe*, de cinq à quinze minutes après le début de l'épreuve.

En général une agglutination nettement retardée ne saurait apporter la certitude recherchée.

Si le microbe à identifier est agglutiné par un sérum spécifique et par le sérum normal, ou par plusieurs sérums spécifiques, il faut recommencer l'épreuve à un taux plus élevé, au 1/50, avec les 4 sérums et rechercher avec quel sérum l'agglutination atteint son taux maximum. D'après les auteurs de la méthode, cette agglutination maxima indiquerait le germe en cause dans les cas à l'étude.

Ce procédé a l'avantage de donner une réponse rapide, et de ne mettre en évidence que l'agglutination spécifique seule, les coagglutinations ne manifestant leur présence que plus tardivement.

Il arrive cependant en certains cas que, même quand il s'agit d'un Méningocoque authentique, l'agglutination obtenue nettement avec le procédé lent reste négative avec cette méthode extemporanée;

(1) Le méningocoque D étant exceptionnel, la recherche de l'agglutination le concernant peut être actuellement considérée comme inutile.

en d'autres, beaucoup plus rares, les coagglutinations peuvent se révéler au même titre que les agglutinations spécifiques.

2° *Procédé lent.*

Disposer une série de tubes à essai destinés à recevoir le mélange sérum-microbes. Théoriquement il suffit de 4 tubes où le même microbe est mis en contact avec le sérum normal, puis les sérums anti-A, B et C, tous dilués à 1 p. 100. Mais en raison de la fréquence des coagglutinations et pour éviter de nouvelles recherches semblables à des taux plus élevés pouvant permettre une interprétation des résultats, il est préférable d'expérimenter d'emblée sur une série de 4 à 5 tubes par sérum.

On préparera donc :

1° Une série de 5 tubes pour le sérum anti-A à 1 p. 100, 1 p. 200, 1 p. 300, 1 p. 400, 1 p. 500.

2° Une deuxième série de 5 tubes pour le sérum anti-B aux mêmes taux successifs.

3° Une troisième série pour le sérum anti-C (mêmes taux).

4° Une quatrième série pour le sérum normal (mêmes taux).

On peut alors opérer de deux façons :

a. Ou bien verser dans chaque tube 1 centimètre cube du sérum dilué aux taux précédemment indiqués, puis émulsionner dans chacun une anse de la culture sur gélose-ascite ou gélose-sérum formolée âgée de vingt-quatre heures.

b. Ou bien émulsionner la culture dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique (pour l'épreuve précédente il faut au moins 2 tubes de culture) ; en verser 9 dixièmes de centimètre cube dans chaque tube, puis un dixième de centimètre cube d'une dilution de sérum à 1 p. 10, 1 p. 20, 1 p. 30, 1 p. 40, 1 p. 50.

Porter à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures et observer.

Voici, sous forme de tableaux, les constatations que l'on peut être appelé à faire :

Première éventualité.

	1/100.	1/200.	1/300.	1/400.	1/500.
Sérum anti-A... ...	+	+	+	+	0
— B	0	0	0	0	0
— C.....	0	0	0	0	0
Sérum normal.....	0	0	0	0	0

Il n'y a aucun doute, le Méningocoque à déterminer appartient au type A.

Deuxième éventualité.

	1/100.	1/200.	1/300.	1/400.	1/500.
Sérum anti-A.....	+	+	+	+	0
— B.....	+	0	0	0	0
— C.....	+	+	0	0	0
Sérum normal.....	+	0	0	0	0

Ici le germe est agglutiné par tous les sérums mais à des taux différents ; mais l'agglutination nettement dominante est obtenue avec le sérum anti-A.

Le Méningocoque appartient au type A.

Troisième éventualité.

	1/100.	1/200.	1/300.	1/400.	1/500.
Sérum anti-A.....	+	+	0	0	0
— B.....	+	+	+	+	+
— C.....	+	+	+	0	0
Sérum normal.....	+	0	0	0	0

Même constatation que précédemment, mais l'agglutination dominante est donnée par le sérum anti-B. Le Méningocoque appartient au type B.

Au cas où l'agglutination dominante serait fournie par le sérum anti-C, il va de soi que le Méningocoque appartiendrait au type C.

Quatrième éventualité.

	1/100.	1/200.	1/300.	1/400.	1/500.
Sérum anti-A.....	+	0	0	0	0
— B.....	+	+	+	+	+
— C.....	+	+	+	+	±
Sérum normal.....	+	0	0	0	0

Le cas est plus délicat. Ce n'est certainement pas un A. Pas d'agglutination nettement prédominante entre les sérums anti-B et

C. Impossible de savoir auquel des deux types B ou C le Méningocoque appartient. A plus forte raison si, comme le fait se présente parfois, les agglutinations sont égales.

Ce simple exposé est de nature à montrer les inconvénients de cette méthode :

1° Manipulations assez longues pour le laboratoire : il faut 20 tubes pour cette recherche.

2° Il faut attendre vingt-quatre heures pour avoir les résultats.

3° Quand deux germes présentent des agglutinations égales ou presque égales (quatrième éventualité), la détermination d'emblée est impossible.

Il semble qu'on pourrait lever une partie de ces difficultés en utilisant des sérums préalablement saturés par les germes hétérologues. Ainsi, le sérum anti-A saturé par B et C, sérum anti-B saturé par A et C; sérum anti-C, saturé par A et B.

Dans ces conditions, chacun d'eux serait dépouillé de ses coagglutinines et ne serait pourvu que de ses agglutinines spécifiques ; on pourrait alors réaliser l'expérience en ne cherchant l'agglutination qu'au 1/100. Quatre tubes seulement seraient alors suffisants pour effectuer la réaction.

Les expériences destinées à réaliser ce progrès sont en cours actuellement.

En attendant qu'elles aient abouti, la meilleure façon de procéder, quand on se trouve en présence d'un germe qu'on soumet à l'épreuve de l'agglutination, paraît être la suivante :

1° Rechercher l'agglutination par le procédé extemporané. Si les résultats sont nets, s'y arrêter.

2° Si les résultats sont nuls ou prêtent à confusion (coagglutinines), utiliser le procédé lent.

Telles sont les méthodes indispensables pour l'identification du Méningocoque et de ses divers types. Cette détermination présente actuellement la plus haute importance, car en raison de la pluralité spécifique de ces germes, il est de toute nécessité de savoir à quel type appartient un Méningocoque pour pouvoir lui opposer, au point de vue thérapeutique, l'antisérum homologue qui seul est capable de combattre spécifiquement son action pathogène.

Toutefois ces épreuves ne peuvent être poursuivies que si l'ensemencement primitif du liquide méningococcifère met le germe en évidence. Il est malheureusement fréquent que, même pratiquée dans de bonnes conditions (examen pratiqué immédiatement après la ponction lombaire), les cultures premières (liquide céphalo-

rachidien, sang, etc.) restent négatives (1). Il convient alors de recourir à des méthodes indirectes qui pourront assez souvent donner la clef du problème.

Procédés indirects.

Plusieurs procédés permettent, quand le Méningocoque n'a pu être isolé, de s'assurer indirectement de la présence de ce dernier, et même parfois du type auquel il appartient.

Analyse chimique. — L'analyse chimique du liquide céphalo-rachidien fournit des éléments différentiels d'une certaine importance avant que le germe ait été décelé, et à plus forte raison quand il n'a pu l'être.

Rappelons que, dans la méningite méningococcique, l'albumino-rachie est généralement supérieure à trois grammes par litre, la glycorachie inférieure à 0gr,40 ou 0gr,50, le taux des chlorures est abaissé (6gr,50 à 7 grammes), celui des cendres supérieur à 8 grammes; dans la méningite tuberculeuse la formule est différente : si l'on constate de l'hypoglycorachie, le taux de l'albumine est inférieur à 3 grammes ; celui des chlorures : 6 grammes en moyenne ; celui des cendres est inférieur à 8 grammes.

Ce procédé permet en outre, en montrant les variations de l'albumine et du sucre, de suivre l'évolution de l'infection méningée.

Malheureusement il ne peut apporter de différenciation nette avec les méningites aiguës streptococciques, pneumococciques, etc., ni permettre de déterminer le type de Méningocoque en cause.

Précipito-réaction. — D'après H. Vincent et Bellot, cette réaction rend de grands services :

Soumettre le liquide céphalo-rachidien à une centrifugation prolongée ; le liquide décanté est versé dans un tube stérile ; à L gouttes on ajoute I à III gouttes de sérum antiméningococcique *non chauffé* ; le tube est hermétiquement bouché au liège ou au caoutchouc ; on prépare de même un tube de contrôle avec du liquide céphalo-rachidien seul. Le tout est mis à l'étuve à 37° ou de préférence à 55°. Au bout de quinze à seize heures, le tube contenant l'antisérum devient opalescent si le Méningocoque est en cause ; le tube témoin reste clair et limpide.

Pour déterminer le type de Méningocoque, il convient d'effectuer cette réaction avec les sérums anti-A, B et C, versés dans trois tubes différents contenant chacun le liquide céphalo-rachidien à experti-

(1) Il est de notion courante, et avérée, que les ensemencements tardifs restent très souvent négatifs, d'où cette règle de pratiquer les examens pour ainsi dire au lit du malade.

ser. Quelques essais ont permis à l'un de nous (Dopter) d'observer une précipitation spécifique exclusivement dans l'un des tubes, et de connaître ainsi la variété du germe infectant.

Toutefois la réaction peut faire défaut; de plus, certains liquides céphalo-rachidiens se troublent, même sans addition de sérum; avec certains autres l'opalescence se produit à un degré égal avec le sérum anti et le sérum normal; enfin elle peut s'effectuer de même avec un liquide où la méningococcie n'est pas en cause. Ces réserves faites, quand elle donne des résultats nets, la précipito-réaction peut apporter à la solution du problème un secours précieux.

Séro-diagnostic. — Le séro-diagnostic peut être effectué par les deux méthodes suivantes :

1° *Agglutination.* — Soit le sérum d'un sujet supposé atteint de méningococcie (méningite ou septicémie). Rechercher l'agglutination à l'aide de ce sérum dilué à 1/40 ou 1/50 vis-à-vis des trois types de méningocoques, A, B et C, conservés au laboratoire. Porter à l'étuve à 37°; observer au bout de vingt-quatre heures : si le résultat est positif, l'agglutination qui se montre dans l'un des tubes avec l'un ou l'autre des germes en expérience, donne la réponse.

Cette épreuve ne donne d'indication nette que si elle est positive; négative, elle ne saurait faire éliminer l'hypothèse de méningococcie. Il faut savoir aussi que les agglutinines n'apparaissent dans le sang des malades que vers le huitième ou dixième jour de l'infection.

2° *Fixation du complément.* — Deux procédés :

a. Effectuer la réaction en mettant en contact avec le sérum du malade les trois types de Méningocoque conservés au laboratoire; donc trois tubes différents contenant l'émulsion microbienne (A, B et C), le sérum du malade, l'alexine de cobaye (Voy. p. 75). Après deux heures d'étuve, ajouter le système hémolytique. Le tube où l'hémolyse est nulle indique le germe en cause.

Mêmes observations que pour l'agglutination.

b. Prendre comme antigène le liquide céphalo-rachidien (1 centimètre cube) que l'on met en présence de sérum antiméningococcique. Ajouter l'alexine, et, dans les mêmes conditions que précédemment, le système hémolytique.

Ici encore, un résultat négatif ne permet pas d'éliminer l'hypothèse d'une méningococcie.

Ces épreuves ne doivent pas être négligées quand l'examen bactériologique direct est resté sans résultat; elles peuvent, en certains cas, faire connaître d'une façon précise la nature du germe qu'il s'agit de déterminer.

SÉROTHÉRAPIE.

Préparation du sérum. — La préparation du sérum antiméningococcique varie un peu suivant les auteurs :

Au début, Flexner immunisait ses chevaux à l'aide de cultures tuées, puis vivantes, de Méningocoques introduites sous la peau, puis dans les veines. Il ajoutait quelques doses d'extrait autolytique qu'il injectait sous la peau. Il a actuellement renoncé à la voie veineuse, et emploie uniquement la voie sous-cutanée.

Kolle et Wassermann immunisent trois chevaux, l'un avec un Méningocoque, un second avec plusieurs échantillons du même germe, un troisième avec l'extrait autolytique. C'est le mélange à parties égales de ces trois sérums qui constitue leur sérum antiméningococcique.

Dopter vaccine ses chevaux à l'aide de cultures vivantes uniquement, injectées sous la peau d'abord, puis dans les veines : il obtient ainsi à la fois un sérum *antimicrobien* et *anti-endotoxique* ; l'expérience sur l'animal et les essais thérapeutiques le prouvent nettement.

Son pouvoir curatif. — L'efficacité du sérum antiméningococcique introduit dans la cavité rachidienne peut s'apprécier par :

1° La diminution du taux de mortalité : alors que les cas traités par les moyens usuels donnent une mortalité de 60 à 70 p. 100, les atteintes traitées par le sérum fournissent une léthalité de 10 à 12 p. 100 ;

2° L'atténuation rapide et progressive de tous les symptômes méningés, la chute de la température, l'amélioration de l'état général et la rareté des séquelles.

Les insuccès que l'on constate parfois sont dus non pas au défaut d'activité du sérum, mais à des causes qui peuvent se résumer ainsi : débilité du malade, son âge, intervention trop tardive, causes anatomiques et particulièrement le cloisonnement de l'espace sous-arachnoïdien, l'oblitération des trous de Magendie, etc., la nature du germe infectant, différent du Méningocoque.

Mode d'emploi. — Il est reconnu actuellement qu'en raison de la pluralité des Méningocoques et de leur spécificité respective, un seul sérum antiméningococcique est insuffisant.

L'expérience a montré qu'un sérum polyvalent n'était pas doué d'une efficacité assez élevée. Seul peut convenir un sérum doué de propriétés spécifiques sur chacun des germes pathogènes en cause dans chaque cas particulier. Il faut donc avoir à sa disposition des sérums anti-A, anti-B, anti-C, anti-D (pour les besoins de la pra-

tique courante, le Méningocoque D étant exceptionnel, le sérum anti-D n'est pas indispensable).

Enfin il est indispensable d'utiliser un sérum trivalent, devant être injecté dans les premiers jours, en attendant que le diagnostic bactériologique ait démontré le type auquel appartient le germe infectant; dès que ce diagnostic est établi, il convient d'user du sérum monovalent correspondant.

Dans la méningite cérébro-spinale, le sérum antiméningococcique injecté sous la peau est complètement dénué d'efficacité. Il s'emploie en *injections intrarachidiennes*, après ponction lombaire préalable.

Il doit être injecté en quantité suffisante (20, 40, 50 centimètres cubes pour un adulte, 10 à 30 centimètres cubes pour un enfant); les doses varient suivant la gravité de l'atteinte. Ces doses doivent être répétées systématiquement plusieurs jours de suite jusqu'à ce que l'examen du liquide céphalo rachidien révèle l'absence de Méningocoques. Elles doivent être reprises dès que l'examen du liquide céphalo-rachidien révèle la moindre reprise des phénomènes méningés. Il est actuellement reconnu que les injections intrarachidiennes n'agissent que sur les lésions méningées, mais restent pour ainsi dire inefficaces sur les localisations extra-méningées de la méningococcie, souvent concomitantes. Il faut donc la plupart du temps adjoindre aux injections dans le rachis les injections sous-cutanées intramusculaires, ou intraveineuses.

Dans les *septicémies méningococciques* et leurs complications, les injections intraveineuses s'imposent.

Le sérum peut s'employer en *injections locales*, notamment dans les localisations suppurées oculaires et les arthrites méningococciques.

CHAPITRE XXIII

GONOCOQUE

Le Gonocoque, agent pathogène de l'infection blennorragique, a été découvert par Neisser en 1879, dans le pus urétral de la blennor-

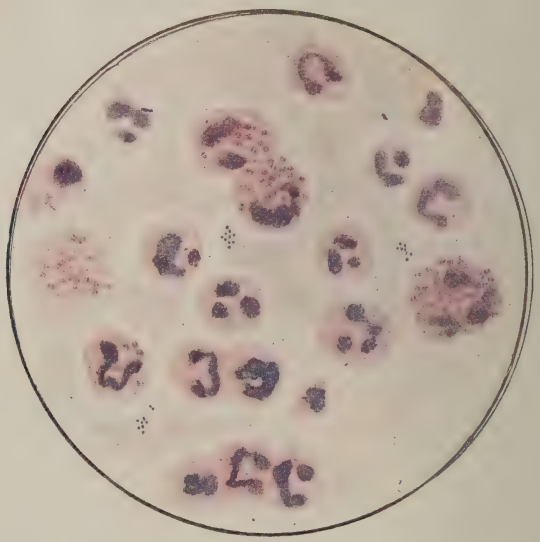

Fig. 164. — Gonocoque dans le pus blennorragique. La figure montre en outre des cocci banaux associés, prenant le Gram.

ragie vulgaire. Il présente de grandes analogies morphologiques avec le Méningocoque et tout le groupe des germes similaires. Il s'en distingue nettement par ses caractères biologiques.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — *Dans les produits pathologiques.* — Le Gonocoque se présente dans le pus blennorragique et les

complications suppuratives connues, sous un aspect spécial.

Isolés, c'est un coccus à forme sphérique : mais le plus souvent il se montre sous l'aspect de *diplocoques* dont chaque élément ressemble à un grain de café ou un haricot, regardant l'élément associé par sa face plane ou légèrement concave.

Ces germes peuvent être libres entre les cellules du pus, mais, en général, ils sont *intracellulaires*. On les rencontre en effet dans la masse protoplasmique des polynucléaires dégénérés ou des larges cellules endothéliales qui s'y mêlent. Ils y sont habituellement nombreux, et certaines cellules en sont tellement bourrées qu'elles éclatent (fig. 164).

Dans les cultures. — Le Gonocoque, cultivant assez difficilement dans les milieux artificiels, perd un peu, dans les cultures, sa forme caractéristique. Les éléments des diplocoques sont plus arrondis ou ovalaires ; de plus, ils sont assez inégaux (fig. 165), au moins lors des premières générations ; on observe des formes géantes d'involution.

Coloration. — Le Gonocoque se colore aisément par toutes les couleurs d'aniline. La fuchsine de Ziehl, le violet de gentiane, la thionine lui conviennent également bien. *Il se décolore par la méthode de Gram.*

Ce caractère important permet de différencier, dans les préparations de pus, des germes associés qui peuvent s'y rencontrer, et être confondus avec lui.

Plusieurs procédés ayant pour but une double coloration ont été proposés :

Procédé de Nicolle. — C'est la méthode de Gram composée, la recoloration étant effectuée par une solution hydro-alcoolique à fuchsine.

1° Traiter par la méthode de Gram.

2° Après décoloration par l'alcool absolu, traiter quelques secondes par :

Solution saturée de fuchsine dans l'alcool à 35°.....	5 centimètres cubes.
Eau distillée.....	100 —

3° Laver, sécher.

Le fond de la préparation et les Gonocoques sont teintés par la fuchsine ; les germes qui ont pris le Gram sont étrangers au Gonocoque (fig. 164).

Procédé de Pick et Jacobsohn. — Laisser la préparation pendant dix secondes en contact avec :

Fuchsine phéniquée de Ziehl.....	XV gouttes.
Solution alcoolique de bleu de méthylène.....	VIII gouttes.
au distillée.....	20 centimètres cubes.

Les Gonocoques sont teintés en bleu foncé ; le protoplasma des éléments cellulaires en rose, les noyaux de ces derniers en bleu clair.

CULTURES.

Le Gonocoque est un aérobie strict. Il végète entre 22° et 40 ; 37° est la température optima pour son développement. Il éprouve cependant de grandes difficultés à pousser dans les milieux de laboratoire. Comme le Méningocoque, il exige le plus souvent des milieux albumineux pour donner une culture abondante et durable.

Bouillon ordinaire et bouillon-ascite. — Dans le bouillon ordinaire, le Gonocoque pousse à peine : vers le deuxième ou troisième jour, un trouble léger se produit, bientôt suivi d'un dépôt qui se forme au fond du tube.

En bouillon-ascite (bouillon, 3 parties ; ascite, 1 partie), le développement est un peu plus abondant ; le trouble se manifeste vers le deuxième jour ; puis des flocons grisâtres se déposent. Quand le Gonocoque a subi plusieurs passages dans ce milieu, il peut s'acclimater au bouillon ordinaire.

De Christmas prépare du bouillon de veau non peptonisé, qu'il concentre en évaporant par l'ébullition au quart de son volume. A 1 partie il ajoute 3 parties d'ascite. Dans ce milieu, le développement est rapide ; les Gonocoques conservent leur forme en grains de café ; les formes d'involution sont rares (Vannod).

Urine. — Finger a montré que le Gonocoque donnait une culture assez abondante dans l'urine non alcalinisée, à laquelle on ajoute 0,5 p. 100 de peptone. Le développement est plus marqué encore quand l'urine est albumineuse (Hammer).

Gélose ordinaire. — Culture très grêle, ne s'effectuant qu'à la faveur des albuminoïdes du pus qu'on ajoute en même temps qu'on pratique l'ensemencement de pus urétral ; mais cette culture, repiquée dans le même milieu, ne pousse pas. Vannod cependant a obtenu des cultures abondantes et repiquables en trente passages avec la gélose ordinaire très faiblement alcalinisée.

Gélose ascite. — La gélose simple ou glycérinée, additionnée d'ascite ou de liquide pleural (1 partie), convient très bien pour la culture du Gonocoque. Au bout de vingt-quatre à trente-six heures, les *colonies isolées* apparaissent arrondies, punctiformes, blanc gri-

sâtre, légèrement translucides, à bords sinueux. Elles atteignent 1 millimètre environ en deux à cinq jours; elles sont alors plus

Fig. 165. — Culture de Gonocoque (gélose-ascite, vingt-quatre heures).

opaques; leur centre est sombre et épais; elles ont une consistance assez visqueuse. Transportées dans une gouttelette d'eau, elles s'émulsionnent, mais d'une façon peu homogène.

Les *stries* forment une glaire mince, grisâtre, un peu transparente ; la surface est humide et brillante.

Gélose de Wassermann. — Le milieu suivant est très favorable à la culture du Gonocoque :

A 15 centimètres cubes de sérum de porc ne contenant pas d'hémoglobine on ajoute 30 à 35 centimètres cubes d'eau, 2 à 3 centimètres cubes de glycérine, et 80 à 90 centigrammes de nutrose. On agite bien ce mélange, et on le chauffe, en l'agitant toujours, jusqu'à l'ébullition. Le liquide, qui était trouble, s'éclaircit. On continue l'ébullition pendant vingt minutes environ, ce qui suffit pour stériliser le liquide quand le sérum est frais. Le liquide est ensuite mélangé à parties égales avec de l'agar contenant 2 p. 100 de peptone, préalablement liquéfiée à 50°, et le mélange est versé dans des boîtes de Petri.

Gélose au sang (Bezançon et Griffon). — Vingt-quatre heures après l'ensemencement du pus, les colonies apparaissent plates,

rondes, humides, brillantes, assez translucides, blanchâtres, tranchant sur le fond brunâtre du milieu.

Gélose Martin-sérum formolé. — Le Gonocoque pousse bien sur ce milieu. Mêmes caractères que sur gélose-ascite.

Gélose T. (p. 295). — Contrairement au Méningocoque, le Gonocoque ne pousse pas sur ce milieu.

Sérum coagulé. — Sur sérum humain (Bumm) ou sérum de lapin (de Christmas) coagulé, les colonies présentent des caractères identiques à ceux qu'on observe sur gélose-ascite.

Gélatine. — Sur gélatine, en *piqûre*, à 22°, on observe au bout de quelques jours un développement léger le long de la piqûre. A la surface une légère dépression se forme, devenant vers le dixième jour une espèce de cupule, constituée plutôt par un ramollissement de la gélatine que par une véritable liquéfaction (Macé). Turro préfère la gélatine acide, c'est-à-dire la gélatine ordinaire non alcalinisée. Mais le développement est très grêle et les colonies sont difficilement repiquables.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité. — La vitalité du Gonocoque, tombé dans le milieu extérieur, est extrêmement faible, qu'il provienne des cultures artificielles ou du pus blennorragique lui-même. Le pus issu de l'organisme, conservé à 0° ou même à la température ordinaire, est stérile en vingt-quatre heures. Il est stérilisé en quelques minutes à 55°. Il en est de même par une exposition à l'air de quelques heures. Ces faits expliquent la fréquence des résultats négatifs quand la culture a été faite plusieurs heures après le prélèvement.

Dans les cultures, la vitalité du Gonocoque est faible. Il ne se conserve qu'à la condition de séjourner en permanence à l'étuve à 37°. S'il est acclimaté aux milieux artificiels, il peut alors survivre trois à quatre semaines au plus. Un séjour de quelques heures à la température du laboratoire le tue régulièrement.

Ce germe est encore très sensible à l'action des antiseptiques, même faibles : le sublimé, les sels d'argent solubles : l'argent aminé à 1 p. 4 000, l'argonium à 1,5 p. 100, le protargol à 1 p. 100, le tuent en cinq à dix minutes.

Réactions biochimiques. — *Indol.* — Pas de production d'indol dans les cultures.

Action fermentative sur les sucres. — Roth a montré que le Gonocoque faisait fermenter les milieux glucosés et restait sans

action sur les autres sucres. C'est là un moyen de différenciation important d'avec le Méningocoque (Voy. p. 320).

Réactions vis-à-vis de l'antisérum. — *Agglutination.* — Un sérum antigonococcique, obtenu par injections de cultures de Gonocoque à l'animal, agglutine ce germe. La recherche s'effectue par le procédé macroscopique, en diluant une anse de culture sur agar dans 1 centimètre cube d'une dilution de sérum. Cette agglutination ne se produit pas avec des cocci étrangers, comme le Staphylocoque, le Streptocoque, etc.

Toutefois elle peut se montrer avec le Méningocoque (Brückner et Cristeanu, Vannod, etc.). Mais, en ce cas, l'épreuve de la saturation des agglutinines (Dopter et R. Koch) démontre d'une façon formelle qu'il s'agit alors de *coagglutinines*, non spécifiques, l'agglutination spécifique étant réservée au seul Gonocoque.

D'après Torrey, un sérum obtenu par vaccination à l'aide d'un échantillon de Gonocoque peut ne contenir d'agglutinines spécifiques que pour ce seul échantillon, et des coagglutinines pour d'autres échantillons du même germe. Il a tendance à admettre que le groupe Gonocoque n'est pas homogène, et qu'il existe des différences spécifiques suivant les races envisagées.

Enfin il résulte des recherches de M. Nicolle, Jouan et Debains que des sérums antigonococciques ne présentant aucun pouvoir agglutinant sur certains échantillons de Gonocoques peuvent l'acquérir si les émulsions microbiennes sont préalablement traitées par l'acide chlorhydrique (méthode de Porges). Ce traitement « démasque » donc l'antigène.

Il est d'ailleurs à remarquer qu'il met aussi en évidence un antigène semblable chez les Méningocoques, car ces derniers traités par la même méthode deviennent agglutinables par le sérum antigonococcique.

Précipitation. — L'extrait autolytique de Gonocoque, additionné d'une minime quantité de sérum antigonococcique, se trouble rapidement : un précipité se forme.

Ce précipité s'obtient de même, mais d'une façon moins marquée, avec l'extrait de Méningocoque. La saturation des précipitines (Dopter) montre que, dans le premier cas seul, la précipitation est spécifique ; elle ne l'est pas dans le second (co-précipitation).

Sensibilisatrice. — D'après les recherches de Vannod, le sérum antigonococcique contient une sensibilisatrice spécifique pour le Gonocoque ; au contraire, mis en présence de Staphylocoque, Streptocoque, etc., et même de Méningocoque, la réaction reste négative. Ces constatations importantes sont de nature à prouver nettement

l'individualité spécifique du Gonocoque, que d'aucuns, Lepierre et Pinto entre autres, ont voulu nier, en déclarant que le Méningocoque et le Gonocoque étaient des germes identiques.

Toutefois, Teayne et Torrey, examinant à cet égard plusieurs échantillons de Gonocoques, ont observé que, vis-à-vis d'un même antisérum, ils se comportaient différemment : certains fixent le complément, d'autres ne le fixent pas. D'après ces faits, le groupe Gonocoque ne serait pas homogène. Pour M. Nicolle, Debains et Jouan, les Gonocoques pourraient fixer le complément en présence des sérums antiméningococciques.

La sensibilisatrice gonococcique a été mise en évidence par plusieurs auteurs (Müller et Oppenheim, Brück, Meakins), dans le sérum de sujets atteints d'arthrite, de salpingite, de prostatite, d'urétrite chronique gonococciques.

D'après Teayne et Torrey, pour être utilisée en vue du diagnostic, et en raison des différences signalées, cette recherche demande à être effectuée après plusieurs races de Gonocoques.

ACTION PATHOGÈNE.

Action pathogène sur l'organisme humain. Habitat. — La *blennorragie* est la détermination la plus fréquente de l'infection gonococcique.

Le Gonocoque se rencontre en effet dans le pus urétral.

Au début de l'écoulement, voici l'aspect que présente le pus : l'examen décèle de nombreux globules pyoïdes, contenant dans leur masse protoplasmique des Gonocoques, mais encore peu nombreux. On constate de plus des cellules endothéliales dont quelques-unes contiennent, elles aussi, des Gonocoques.

Au troisième ou quatrième jour, les Gonocoques sont beaucoup plus abondants, et les leucocytes qui les ont phagocytés sont nombreux; il n'est pas rare d'en compter un sur cinq ou six qui sont littéralement bourrés de diplocoques.

Puis les cellules épithéliales disparaissent, et l'on voit apparaître des germes d'association secondaire.

Enfin, quand l'urétrite passe à la phase chronique, ces cellules épithéliales redeviennent fort nombreuses, contenant quelques Gonocoques, alors que les leucocytes se raréfient et sont dénués d'éléments microbiens.

Dans les *coupes* d'urètre blennorragique, les Gonocoques se trouvent dans les couches les plus superficielles de l'épithélium ; ils siègent de préférence dans leur intervalle; ils envahissent parfois la

profondeur et vont déterminer des petits abcès glandulaires, puis urétraux, qui entretiennent si longtemps l'infection. Enfin ils peuvent passer dans la circulation pour envahir l'organisme et déterminer les complications générales.

Le Gonocoque est encore responsable de la *vulvo-vaginite des petites filles*; on le trouve dans la blennorragie ano-rectale.

Ce germe détermine les complications des organes voisins et des complications éloignées : les *métrites*, les *salpingites*, les *pelvi-péritonites* post-blennorragiques relèvent parfois des microbes associés, mais aussi du Gonocoque; l'*épididymite*, l'*orchite*, la *funiculite*, la *cystite*, certains cas de *néphrite* sont sous sa dépendance; enfin on connaît la *conjonctivite* de l'adulte et l'*ophtalmie* des nouveau-nés, dont il est l'agent infectieux.

Parmi les complications à distance et d'ordre circulatoire, notons l'*arthrite blennorragique*, où le Gonocoque se décèle, non pas dans le pus, mais dans la synoviale et les tissus péri-articulaires. Le Gonocoque se localise parfois aussi au niveau de l'endocarde, où il provoque l'éclosion d'une *endocardite infectieuse*; on connaît des *myélites*, des *méningites suppurées* gonococciques. Enfin la *gonococcémie*, ou septicémie gonococcique, est actuellement connue.

Action pathogène expérimentale. — Des essais d'inoculation de cultures de Gonocoque dans l'*urètre de l'homme* ont été tentés pour en démontrer la spécificité. Entre les mains de Bumm, Bockart, Kiefer, Bokai, ces épreuves ont été positives, et la blennorragie ainsi provoquée présentait des caractères semblables à ceux de la gonorrhée contractée à la suite d'un coït infectant.

Chez l'animal, les injections intra-urétrales sont, dans la plupart des cas, restées négatives. Seul, Fonseca a pu provoquer chez le lapin une blennorragie légère qui ne dura qu'une semaine.

L'instillation de cultures de Gonocoques sur la conjonctive du cobaye produit une légère conjonctivite, dont les éléments purulents contiennent du Gonocoque (Legrain). Morax est arrivé, chez le jeune lapin, à produire ainsi une conjonctivite purulente caractéristique. Mais, dans tous ces essais, on n'observe pas de multiplication du germe ; c'est ce que Morax, puis Debré et Paraf ont constaté à la suite de l'injection dans la chambre antérieure de l'œil chez le lapin.

Citons le fait intéressant de Malowski, qui détermina chez une lapine une salpingite mortelle avec péritonite, après une injection dans la cavité utérine.

Les *inoculations sous-cutanées* sont inoffensives.

L'*inoculation intraveineuse* tue l'animal (lapin, cobaye), quand la

dose est suffisante, mais il ne se forme pas de septicémie : l'animal succombe sans doute par toxémie, car on ne retrouve le Gonocoque ni dans la circulation ni dans les viscères.

L'*inoculation intrapéritonéale* détermine chez le cobaye une péritonite suppurée mortelle, où les Gonocoques injectés ont en grande partie disparu.

TOXINE.

L'expérimentation sur l'animal montre qu'il succombe par intoxication, beaucoup plus que par infection. De plus, l'injection de cultures tuées par la chaleur provoque les mêmes phénomènes qu'avec les cultures vivantes. C'est l'indice de l'existence d'une toxine gonococcique. Mais, alors que de Christmas prétend qu'il s'agit d'une toxine soluble (gonotoxine), d'autres, comme Wassermann, Nicolaysen, Morax, estiment que le poison se trouve inclus dans le corps microbien.

Mode d'obtention. — ***Procédé de De Christmas.*** — De Christmas fait une culture avec son bouillon de veau non peptoné, additionné de trois quarts de liquide ascitique. Il abandonne la culture à l'étuve à 37°, pendant vingt à trente jours; puis il filtre. Le filtrat est la gonotoxine; elle est précipitable par l'alcool absolu et le sulfate d'ammoniaque.

Procédé de Nicolaysen. — Nicolaysen dessèche une culture de Gonocoque sur gélose; après broyage, il obtient une poudre toxique pour la souris.

Procédé de Vannod. — Vannod emploie le procédé connu de la préparation des nucléo-protéides.

Il émulsionne des cultures de quatre jours sur agar-ascite dans une solution de potasse à 1 p. 100, pendant deux à trois heures.

La nucléo-protéide est précipitée par addition d'acide acétique à 1 p. 100. On filtre, et le précipité restant sur le filtre est lavé à l'eau stérile jusqu'à ce que le liquide soit devenu neutre. On recueille le précipité sur le filtre, on le dessèche dans le vide. La poudre blanc grisâtre qui en résulte est broyée dans un mortier. C'est la nucléo-protéide, que l'on dissout dans une solution de carbonate de soude à 1 p. 100 pour l'injecter aux animaux.

Effets pathogènes. — L'inoculation *sous-cutanée* chez le lapin détermine une inflammation locale énorme, s'accompagnant de fièvre et d'un amaigrissement marqué, et se terminant souvent par un abcès; l'animal succombe par cachexie.

L'*inoculation intraveineuse* provoque les mêmes phénomènes généraux.

L'*injection intrapleurale* détermine la production d'un exsudat purulent, toujours stérile.

Introduite dans la *chambre antérieure de l'œil*, la toxine provoque la formation d'un hypopion et l'ulcération de la cornée.

Enfin, chez l'animal, l'*injection urétrale* reste dénuée d'effets pathogènes. Chez l'homme, au contraire, injectée à la dose de 1 centimètre cube, elle amène un écoulement purulent sans Gonocoques, avec douleurs à la miction, absolument analogue à l'écoulement blennorragique.

L'*injection intracérébrale* de la toxine chez le cobaye est très sévère ; elle le tue en cinq à dix heures, à la dose de 1/100 ou 1/1 000 de centimètre cube.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic bactériologique de l'infection gonococcique urétrale est habituellement simple dans les cas aigus ; l'examen microscopique seul suffit pour l'établir ; il est moins facile dans les cas chroniques. Il en est de même dans les complications génito-urinaires, surtout chez la femme. Il convient alors de soumettre les produits prélevés à toutes les épreuves capables d'identifier le Gonocoque. Cette règle s'applique encore aux manifestations extragénitales où la rigueur du diagnostic s'impose pour éviter toute cause d'erreur.

Prélèvement du matériel de recherche. — Cette partie de la technique présente une importance capitale, car d'un prélèvement bien ou mal effectué dépendent souvent les résultats positifs ou négatifs de l'expertise.

Pus urétral chez l'homme. — Laver préalablement le méat urinaire. Faire sourdre une goutte de pus qu'on étale sur une lame de verre. Pour cet étalement, éviter, comme on le fait souvent pour l'envoyer au laboratoire, de recouvrir d'une lamelle ; dans ces conditions, les bords se dessèchent, et, dans la partie centrale, les cellules et les Gonocoques s'altèrent. Il faut étaler sur place la goutte de pus, à l'aide d'une autre lame ou d'une carte de visite, de façon que l'étalement soit mince et uniforme. Éviter dans cette manœuvre le moindre traumatisme, pour éviter que les leucocytes contenant les Gonocoques n'éclatent, et que ces derniers ne deviennent libres, ce qui enlèverait ainsi un caractère important pour le diagnostic.

En cas d'urétrite chronique, prélever de la même façon la goutte purulente du matin. Sinon, recueillir les filaments qui nagent dans l'urine récemment émise, et étaler sur lame, comme il vient d'être

dit ; cet étalement exige toutefois un certain traumatisme dont il faut tenir compte dans l'appréciation des résultats.

Pus génital chez la femme. — Chez la femme, on a naturellement tendance à prélever le pus au niveau du vagin ou de la vulve. Il n'est pas démontré que le Gonocoque y pullule ; d'ailleurs, s'il existe en ces régions, il est associé à de nombreuses bactéries étrangères qui compliquent le diagnostic.

Sauf dans le cas de vulvo-vaginite des petites filles, où cette technique s'impose cependant, il faut prélever le pus au niveau de l'*urètre*, de même aussi au niveau du *col utérin*, où les Gonocoques sont particulièrement fréquents, de même encore au niveau des follicules et des glandes de Bartholin.

Enfin, au cours des opérations nécessitées par des *salpingites*, etc., on recueille et on étale le pus dans les mêmes conditions.

Pus ano-rectal, conjonctival, etc. — Dans l'ano-rectite gonococcique, recueillir la sécrétion anale avec un instrument mousse, une curette ou une sonde cannelée.

Pour la conjonctivite, la technique ne présente aucune difficulté.

Sérosités articulaires. — Faire aseptiquement une ponction exploratrice, et étaler le liquide obtenu comme il a été dit. Mais rappelons ici que le Gonocoque se trouve de préférence dans la synoviale ou dans les tissus péri-articulaires.

Pus méningé. — Ponction lombaire ; centrifugation du liquide céphalo-rachidien. Étalement sur lames du culot de centrifugation, comme avec le pus urétral.

Sang. — En cas de phénomènes septicémiques, inutile de pratiquer l'examen sur lames. L'hémoculture s'impose : ensemencer 5 centimètres cubes de sang prélevés par ponction veineuse dans 400 à 500 centimètres cubes de bouillon-ascite.

Examen microscopique direct. — Fixer la préparation par l'alcool-éther ; laisser sécher ; colorer. Diverses méthodes peuvent être utilisées :

1° *Coloration simple* par la thionine, le bleu de méthylène, etc. Cette méthode montrera, outre les leucocytes et les cellules épithéliales, les Gonocoques avec leur morphologie habituelle et leur situation intracellulaire (fig. 164), mais elle ne permettra pas de les distinguer des microbes banaux, qui prennent le Gram.

2° *Méthode de Gram composée.* — Colorer par la méthode de Gram, puis, après l'action décolorante de l'alcool absolu, recolorer par l'éosine ou de préférence la fuchsine de Ziehl diluée à 1 p. 10. Les Gonocoques sont teintés en rouge.

Ce procédé présente l'avantage de différencier nettement le

Gonocoque d'une série de germes similaires pouvant même vivre à l'état saprophytique dans l'urètre normal; ces pseudo-Gonocoques en effet ne se décolorent pas par la méthode de Gram.

Identification. — Quand les constatations fournies par l'examen microscopique direct sont nettes et montrent le Gonocoque avec tous ses caractères, l'ensemencement destiné à l'identification est inutile. Il devient indispensable quand les résultats de l'observation sont flous et discutables.

Cultures. — On ensemence abondamment le pus suspect, ou le sang retiré par hémoculture, sur les milieux électifs : gélose-ascite, gélose au sang. Mettre à l'étuve à 37°. Au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, si des colonies ont poussé, les examiner ; en prélever une parcelle, qu'on dilue dans une goutte d'eau sur une lame; examiner après coloration.

S'il s'agit d'un diplocoque en grain de café, ne prenant pas le Gram, faire un nouvel ensemencement sur gélose-ascite pour rechercher les propriétés biologiques.

Agglutination. — On recherche ensuite l'agglutination par la technique habituelle (Voy. *Méningocoque*, p. 324) à l'aide d'un sérum antigonococcique polyvalent.

Fermentations sucrées. — Les fermentations sucrées se recherchent comme pour le Méningocoque. Rappelons que le Gonocoque fait fermenter la glucose seule.

Interprétation des résultats. — Quand ces épreuves ont montré la présence du Gonocoque authentique, le doute n'est pas permis : l'infection en cause est bien gonococcique. Mais souvent, surtout dans les cas chroniques, le Gonocoque peut être rare et passer inaperçu. Il faut alors multiplier les recherches et réitérer les épreuves précédentes. De même encore, le Gonocoque peut avoir disparu, après avoir existé pendant le stade aigu de l'infection. Le fait se constate surtout dans les cas d'arthrite blennorragique, dans les salpingites et pelvi-péritonites, où le germe spécifique est souvent remplacé par des associations secondaires.

Dans les urétrites chroniques, on peut provoquer momentanément la réapparition du Gonocoque par une instillation au nitrate d'argent, ou l'épreuve de la bière, comme le conseillait Neisser.

Dans les autres cas, où la réapparition du Gonocoque ne peut s'effectuer, avant de nier la nature gonococcique de l'infection en cause, on pourra avoir recours aux méthodes de *séro-diagnostic.*

Séro-diagnostic. — Tenter l'*agglutination* d'un ou plusieurs échantillons de Gonocoques conservés au laboratoire par le sérum du malade; cette épreuve a donné en quelques cas de bons résultats.

M. Nicolle, Debains et Jouan recommandent pour cette recherche l'épreuve de l'agglutination sur une culture de Gonocoques traités préalablement par l'acide chlorhydrique (méthode de Porges) qui les rend plus agglutinables.

Ou bien pratiquer la recherche des sensibilisatrices par la *fixation du complément*, en mettant en présence le sérum du malade et un ou plusieurs échantillons de Gonocoques.

Ces épreuves de séro-diagnostic sont encore indiquées pour déceler la nature gonococcique de complications pseudo-rhumatismales ou autres.

SÉROTHÉRAPIE.

Plusieurs auteurs ont cherché à obtenir un sérum antigonococcique thérapeutique en vaccinant le cheval, la chèvre, etc., avec des produits gonococciques divers.

De Christmas vaccine des chèvres à l'aide d'injections sous-cutanées de sa toxine. Le sérum obtenu neutralise la toxine *in vitro* et préserve le cobaye contre l'injection intracérébrale de toxine.

Brückner et Cristeanu vaccinent des chevaux à l'aide de cultures vivantes. Leur sérum est agglutinant et préserve le lapin contre l'infection péritonéale mortelle.

Vannod traite ses animaux par des injections intraveineuses de nucléo-protéide gonococcique.

Rogers et Torrey ont préparé un sérum polyvalent par inoculation intrapéritonéale à la chèvre de cultures sur agar-ascite, provenant de plusieurs races de Gonocoques. A l'aide du sérum ainsi obtenu, ils ont traité avec succès, par injections sous-cutanées, des arthrites aiguës et chroniques, des épididymites blennorragiques, mais ils n'ont observé aucun résultat satisfaisant sur les urétrites, vaginites, conjonctivites. Peut-être eussent-ils obtenu de meilleurs résultats en portant le sérum au contact direct avec les lésions. En effet, Louis, Swinburn, Zigler, Cinffo, Colombo, etc., n'ont enregistré, par la voie sous-cutanée, que des insuccès. Les essais tentés par Debré et Paraf dans l'arthrite blennorragique en injectant le sérum dans la cavité articulaire sont plus encourageants : sur 15 cas graves, la guérison est survenue 6 fois en huit jours, et 8 fois en moins de quinze jours.

VACCINOTHÉRAPIE.

Plusieurs auteurs ont tenté sur l'homme des essais de vaccinothérapie par la méthode opsonisante de Wright : après une phase

négative de quarante-huit heures au cours de laquelle les symptômes semblent s'aggraver, survient une amélioration très marquée durant trois à cinq jours, amélioration qui peut être continuée par une nouvelle injection plus forte que la première.

Cette vaccinothérapie présenterait plus d'efficacité vis-à-vis des complications blennorragiques, l'arthrite en particulier, que dans l'urétrite elle-même.

Signalons des résultats fort encourageants obtenus par les *vaccins sensibilisés* antigonococciques préparés suivant la méthode de Besredka (Cruveilhier) dans le traitement du rhumatisme blennorragique, des salpingites, des orchites, etc.

Il en est de même avec le *vaccin fluoré* de Ch. Nicolle et Blaizot, préparé avec une émulsion de *gonocoques* et de *synocoques* (souvent associés au gonocoque dans la blennorragie).

Enfin, le *lipo-vaccin*, préparé par Le Moignic, Sézary et Demonchy est doué d'un pouvoir curatif incontestable sur les complications articulaires et testiculaires de nature gonococcique. D'après les auteurs, il agirait également d'une façon heureuse sur la blennoragie, dont l'écoulement n'excéderait pas 8 à 15 jours. Si, à cette époque elle n'a pas complètement disparu, les lavages au nitrate d'argent à 1 p. 2000 assureraient alors rapidement la guérison.

CHAPITRE XXIV

MICROCOCCUS MELITENSIS

(*Coccus de la fièvre de Malte*)

Le *Micrococcus melitensis* est l'agent pathogène spécifique de la fièvre ondulante, ou fièvre de Malte, ou fièvre méditerranéenne, appelée encore mélitococcie. Découvert par Bruce en 1887, il a été

Fig. 166. — Culture de *M. melitensis* sur gélose âgée de vingt-quatre heures.

l'objet de travaux sans nombre depuis ces dernières années, où la fièvre de Malte a sévi sur toute la côte méditerranéenne, en Italie, en Grèce, en Turquie d'Europe et d'Asie, dans nos possessions algériennes et tunisiennes, enfin en France, dans sa région méridionale (Cantaloube, Thibault, Lagriffoul, Roger, etc.), voire même dans l'intérieur du continent, à Lyon, Paris, Fontainebleau, dans la Somme.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — Le *Micrococcus melitensis* (fig. 166) est un coccus rond ou légèrement ovale, prenant par conséquent une forme cocco-bacillaire. Il est isolé ou en diplocoque ; il est parfois disposé en courtes chaînettes. Il ne possède ni spores, ni capsules, ni cils ; vu à l'état frais, il est immobile ou présente des mouvements moléculaires qui ne lui constituent pas une véritable mobilité.

Coloration. — Il fixe assez faiblement les couleurs d'aniline usuelles et ne prend pas le Gram.

CULTURES.

Le *M. melitensis* ne vit qu'en aérobiose ; ses cultures sont toujours maigres, même à 37°, qui est la température optima ; de plus, elles sont lentes.

Bouillon. — A 37°, il ne trouble le bouillon qu'après trois jours d'étuve ; ce trouble est uniforme ; pas de voile à la surface.

Gélatine. — Culture très grêle, ou même nulle. Le milieu n'est pas liquéfié.

Gélose. — Sur gélose, ou de préférence sur gélose glycérinée, les *colonies isolées* sont petites, transparentes, pouvant atteindre un diamètre de 2 à 3 millimètres. Elles deviennent ensuite saillantes, brillantes, opalescentes, et prennent un aspect *blanc de perle*.

En *piqûre*, les colonies apparaissent d'abord isolées, puis deviennent confluentes, formant une strie qui devient ultérieurement jaunâtre.

Pomme de terre. — Développement insignifiant.

Lait. — Pousse dans le lait, sans provoquer de coagulation.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité et résistance. — La vitalité de *M. melitensis* varie suivant les conditions et les milieux où il se trouve.

Dans les cultures, il est très résistant, puisqu'on le trouve vivant après huit ou neuf mois en culture sur gélose (Shaw) ; sur les vêtements il résiste entre quinze et quatre-vingts jours. Dans l'eau, d'après Horrocks, il n'y vivrait pas plus d'une semaine. Dans les échantillons de terre stérile, il ne succombe qu'après deux mois et demi environ. Dans le lait il vit vingt jours ; dans l'urine, quatre-vingts jours, malgré l'acidité et la concurrence microbienne.

Il est assez sensible à la chaleur, puisqu'un chauffage à 60° le tue en trente minutes. Les antiseptiques, notamment l'acide phénique

à 1 p. 100, le tuent en quelques minutes ; sous l'influence de la dessiccation, il peut conserver sa vitalité durant plusieurs mois.

Réactions chimiques. — Ce germe ne fait pas d'indol dans les cultures, pas d'acides : le lait reste alcalin ; enfin il ne fait fermenter aucun sucre.

Réactions vis-à-vis du sérum des sujets infectés. — ***Agglutinabilité.*** — Le sérum de l'homme atteint de fièvre ondulante est agglutinant pour le *Coccus melitensis*. Il en est de même du sérum des chèvres infectées spontanément et expérimentalement. On verra plus loin le parti que l'on peut tirer de cette propriété pour établir un séro-diagnostic.

Fixation du complément. — Ce germe fixe le complément dans la réaction de Bordet-Gengou, quand on le met en présence de sérum d'animaux vaccinés, ou d'homme infecté (Sicre).

Produits toxiques. — Le *M. melitensis* n'élabore de produits toxiques qu'en très faible quantité. Shaw a montré que des cultures en bouillon filtrées sur bougie Chamberland sont presque dénuées de toxicité quand elles sont injectées au singe. Il en est de même des cultures tuées à 60°.

CONDITIONS DE L'INFECTION NATURELLE.

Siège dans l'organisme. — Les recherches bactériologiques pratiquées pendant la vie et à l'autopsie des sujets ayant succombé à la fièvre de Malte montrent que le coccus de Bruce est répandu dans tout l'organisme. Il siège dans le sang et certains viscères, plus particulièrement la rate, le foie, le rein ; toutefois on estime que dans le sang son abondance est faible ; c'est pendant les accès fébriles qu'on le décèle le plus facilement. On le retrouve encore dans les ganglions mésentériques et la moelle osseuse. Dans l'urine, il est fréquent. Eyre l'a rencontré dans les matières fécales.

On a toujours constaté son absence dans le poumon, la plèvre, le cerveau, la sueur. Notons que Durham a observé sa persistance dans l'urine chez les convalescents.

Chez la *chèvre* infectée spontanément, on observe la même répartition ; il se trouve en général constamment dans le lait.

La constatation du *Coccus melitensis* dans l'urine, le lait, est de nature à expliquer comment le germe peut être répandu dans le milieu extérieur et être apte à contaminer les sujets sains entourant le malade ; ceux-ci peuvent donc s'infecter par contact direct ou indirect. L'ingestion de lait de chèvre infectée paraît être le mode de contamination le plus fréquent pour l'homme.

Modes de contagion. — La fièvre de Malte est avant tout une infection des chèvres, surtout des chèvres maltaises. Elle peut se propager à tous les animaux domestiques (mulets, vaches, brebis, moutons) et à l'homme.

L'homme s'infecte directement par ingestion du lait ou de ses dérivés, le fromage notamment ; par contact direct avec ces animaux (c'est le cas des bergers et des laitiers); la contamination peut être encore indirecte par ingestion d'aliments (salades, légumes crus) souillés par l'urine infectée.

Enfin, la contagion interhumaine est indéniable, l'urine des malades pouvant souiller les milieux extérieurs où l'entourage prend le contact.

Voies d'infection. — L'infection prend accès par les voies digestives, respiratoires (inhalation de poussières bacillifères), muqueuses (conjonctive et peut-être muqueuse génitale). Enfin l'infection cutanée est possible, à la faveur des excoriations sur lesquelles se répandent des liquides contaminés.

ACTION PATHOGÈNE EXPÉRIMENTALE.

Il est facile de conférer l'infection mélitococcique au *singe* et à la *chèvre*, tous deux très réceptifs.

Chez le *singe*, elle est réalisée à la suite de l'*injection sous-cutanée* d'une minime quantité de culture. Il la contracte encore à la suite de l'*ingestion* de lait de chèvre infectée, ou d'aliments arrosés d'une culture vivante, ou d'urine renfermant le coccus de Bruce. L'*inhalation* de poussières virulentes donne les mêmes résultats (Shaw). Enfin le seul contact d'une culture avec les muqueuses conjonctivale, rectale, génitale, peut infecter cet animal.

Deux à cinq ou six jours après l'inoculation, la température s'élève, présentant des rémissions quotidiennes, comme dans l'infection humaine. La fièvre peut ainsi durer plusieurs mois, pour évoluer vers la guérison ou la mort; cette dernière se produit habituellement vers le quinzième jour. L'autopsie montre l'absence de plaques de Peyer, mais le foie et la rate sont congestionnés et hypertrophiés. On y décèle le *M. melitensis*.

Pendant la vie, le sérum est agglutinant pendant la première semaine.

La *chèvre* présente des symptômes atténués, à la suite des mêmes inoculations. Le coccus de Bruce se retrouve dans les viscères, le sang, l'urine, le lait.

A la suite de l'ingestion de produits virulents, elle peut ne pré-

senter aucun symptôme morbide; l'infection ne s'en déclare pas moins, ainsi que les examens bactériologiques le font constater; une chèvre infectée, et saine on apparence, peut éliminer le germe par le lait et les urines pendant un temps fort long. Cette notion est de la plus haute importance au point de vue épidémiologique et prophylactique.

Le *cheval*, le *mulet*, la *vache*, le *mouton* sont très réceptifs.

Les animaux de laboratoire, *lapin* et *cobaye*, sont plus résistants. L'inoculation sous-cutanée n'est suivie d'aucun trouble. Cependant on peut les infecter et même les tuer par les injections intrapéritonéales, intraveineuses (Carbone), intracérébrales (Durham et Eyre). L'injection péritonéale détermine une orchite.

Le *rat* et la *souris* seraient réfractaires.

La *poule* succombe après un amaigrissement marqué quand elle a reçu une culture sous la peau ou par ingestion (Conor).

L'*homme* enfin peut s'infecter expérimentalement à la faveur des contaminations de laboratoire. Widal, Kindberg et Cotoni, J. Courmont ont rapporté des faits indiscutables de ces infections accidentelles. Carbone, Mac Fadyen ont succombé dans ces conditions.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA MÉLITOCOCCIE.

Recherche du germe spécifique. — *Hémoculture.* — Prélever 5 à 10 centimètres cubes de sang dans une veine du pli du coude, de préférence le soir, quand la température atteint 39°; au-dessous de 38°, le coccus n'a jamais pu être isolé.

Ensemencer la totalité du prélèvement dans 200 à 250 centimètres cubes de bouillon. Porter à l'étuve à 37°. Si, après trois à cinq jours, un trouble se produit, examiner directement, et réensemencer en gélose pour l'identification.

L'hémoculture aboutit à l'isolement du germe dans 65 à 80 p. 100 des cas (Shaw). La présence du coccus peut être révélée parfois dans les premiers jours de l'infection.

Ponction de la rate. — Cette épreuve donne d'excellents résultats, plus constants que ceux de l'hémoculture, mais elle peut amener des hémorragies mortelles. Après piqûre de la rate, pendant que le malade suspend sa respiration, aspirer. Ensemencer en bouillon ou gélose le suc splénique obtenu.

Recherche dans l'urine. — Centrifuger, ensemencer le culot comme précédemment. Le diagnostic, par ce procédé, est assez aléatoire, en raison de l'irrégularité de l'élimination microbienne par cette voie.

Identification. — Se baser sur les caractères décrits, notamment : la morphologie, l'absence de coloration par le Gram, et l'agglutination à un taux élevé par le sérum des animaux vaccinés (1 p. 1000). Au besoin, inoculer des animaux sensibles, le singe de préférence.

Séro-diagnostic. — Le séro-réaction a permis à Wright, Birt et Lamb d'établir le diagnostic de mélitococcie en maints cas où l'isolement du germe n'avait pu être effectué.

Technique. — D'après Ch. Nicolle, utiliser une culture sur gélose âgée de trois à cinq jours ; l'émulsionner dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique ; vérifier son homogénéité.

Wright conseille le procédé macroscopique : verser dans de petits tubes quantité égale d'émulsion et de sérum dilué à des taux divers; observer au bout de vingt-quatre heures. L'agglutination est déclarée positive quand, comparativement à un tube témoin renfermant l'émulsion seule, le liquide s'est éclairci, et qu'un dépôt s'est formé au fond du tube. Gardon emploie le procédé microscopique en additionnant IX, XIX, XXIX, etc., gouttes d'émulsion d'une goutte de sérum.

L'observation se fait au microscope sur une goutte du mélange placée entre lame et lamelle.

Au lieu du sérum, on peut se servir du lait, de l'urine (Zammit), de la salive (Pollaci et Ceraulo) ; ces derniers auteurs auraient utilisé avec succès la sérosité du vésicatoire.

Appréciation des résultats. — Appliquée par de nombreux auteurs, la méthode du séro-diagnostic a donné parfois des résultats contradictoires. Actuellement même, tous ne s'entendent pas sur sa valeur. Ces discordances doivent dépendre d'une technique défectueuse ou d'interprétations erronées.

On a été frappé, en effet, de voir des agglutinations paraissant nettement positives avec le sérum de sujets atteints d'infections étrangères à la mélitococcie: fièvre typhoïde, septicémies tuberculeuses et autres, typhus exanthématique, kala-azar, etc. Certains sérums normaux mêmes sont agglutinants à 1 p. 30, 1 p. 60.

D'après Nègre et Raynaud, ces résultats discordants tiennent à la présence, dans certains sérums, d'*agglutinines non spécifiques*, qu'ils opposent aux *agglutinines spécifiques*, seules contenues dans le sérum des mélitococciques. En chauffant préalablement à 56° pendant une demi-heure le sérum à expertiser, on fait disparaître les coagglutinines. Ils en concluent que tout sérum doit subir ce chauffage avant d'être mis en contact avec les cultures.

De plus, d'après les mêmes auteurs, puis Manceaux, certains

échantillons de *M. melitensis* sont agglutinables par des sérums normaux; d'autres ne présentent pas ce pouvoir; ce sont donc ces derniers qu'il faut utiliser pour cette recherche.

L'agglutination apparaît le plus souvent en moyenne vers le cinquième ou sixième jour; elle est parfois retardée. Il faut savoir aussi que le pouvoir agglutinant d'un sérum varie dans des proportions importantes et même peut disparaître d'un jour à l'autre. Si donc on le trouve négatif, il est essentiel de recommencer l'expérience le lendemain ou les jours suivants.

Une autre cause de réaction négative a été mise en lumière par Nègre et Raynaud: à côté de la mélitococcie, il existe une infection (paramélitococcie) produite par un germe très voisin: *M. paramelitensis*. Ce dernier, inagglutinable par les sérums de mélitensiques, est agglutiné uniquement par les sérums paramélitensiques.

En cas de réaction négative avec une culture de *M. melitensis*, il y a donc lieu de rechercher l'agglutination avec son congénère.

Fixation du complément. — Le diagnostic peut être encore fait par la recherche des ambocepteurs dans le sérum des malades (Sicre, Gouget, Agasse-Lafont, etc.).

VACCINATION. — SÉROTHÉRAPIE.

Une première atteinte de mélitococcie semble conférer l'immunité.

Eyre a montré que les chèvres supportent facilement les injections de cultures tuées, mais ce procédé ne paraît pas conférer l'immunité contre les cultures vivantes.

H. Vincent et Collignon ont réalisé la vaccination active à l'aide d'autolysats provenant de cultures sur gélose.

Rey a utilisé les injections vaccinales de cultures tuées pour le traitement de la fièvre de Malte: en injectant sous la peau tous les huit jours 0cc,25 de cultures mortes, il aurait obtenu des résultats favorables. Basset-Smith a fait les mêmes tentatives thérapeutiques: il inoculait 0cc,5 à 1 centimètre cube de culture sur gélose, tuée par un chauffage à 60° pendant trente minutes. Les formes aiguës traitées par ce procédé furent aggravées; les atteintes à allure chronique furent améliorées, et leur durée fut réduite.

En 1895, Wright traita des malades avec du sérum de chèvres vaccinées. Ces essais répétés par Neusser, Fonstanos, ne furent guère encourageants; il en fut de même des tentatives faites par Shaw, Eyre, Ewald avec du sérum de cheval immunisé. Plus heureux sont les résultats obtenus par Ed. Sergent et Lhéritier avec le sérum de chevaux préparés par des injections d'endotoxine.

CHAPITRE XXV

BACILLE PYOCYANIQUE

Le Bacille pyocyanique, agent du *pus bleu*, a été découvert par Gessard (1882), qui a bien étudié sa fonction essentielle, le pouvoir chromogène. Charrin a consacré ensuite à la *maladie pyocyanique*

Fig. 167. — Bacille pyocyanique. Gélose âgée de vingt-quatre heures.

expérimentale une série d'études qui dépassaient de beaucoup à l'époque le domaine du Bacille pyocyanique et ont résolu ou amorcé nombre de problèmes relatifs aux propriétés des bactéries pathogènes.

Actuellement, la fréquence et l'importance des affections à Bacille pyocyanique sont assez limitées.

MORPHOLOGIE.

Caractères microscopiques. — La forme type est un Bacille court, mesurant 1 μ à 1 μ, 5 sur 0 μ, 5, isolé ou réuni en petits amas peu cohérents. C'est l'aspect ordinaire sur les milieux d'usage courant.

Modifications morphologiques provoquées. — L'addition aux milieux de cultures de substances antiseptiques à faible dose provoque des modifications de forme (fig. 168 à 171) : on obtient des formes en coccus avec

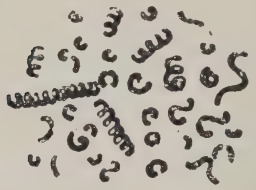

Fig. 168. — Culture en bouillon boriqué.

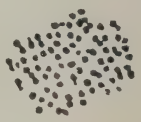

Fig. 169. — Culture en bouillon créosoté.

1 p. 1 000 de créosote ; en spirilles avec l'acide borique à 7 p. 1 000; en longs Bacilles avec 4 p. 100 d'alcool; en filaments avec 0,15 p. 1000 de bichromate de potasse (Guignard et Charrin). Ces variations sont temporaires ; la forme type réapparaît par ré ensemencement sur milieux ordinaires.

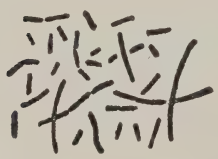

Fig. 170. — Culture en bouillon alcoolisé.

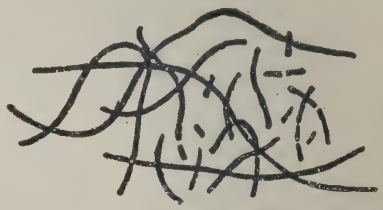

Fig. 171. — Culture en bouillon bichromaté.

Coloration. — Le Bacille de Gessard se colore bien par les couleurs d'aniline. *Il ne prend pas le Gram.*

Mobilité, cils, spores. — Le Bacille pyocyanique est nettement mobile ; il présente un seul cil à une extrémité. Il ne donne pas de spores.

CULTURES.

Caractères généraux. — Anaérobie facultatif, le Bacille pyocyanique se développe beaucoup mieux à l'air. La température eugénésique est 37° ; on obtient encore des cultures à 15° et à 43°,

Bouillon. — Le bouillon se trouble uniformément en vingt-quatre heures; après un à trois jours se montre un voile blanc, assez épais, chagriné. Le bouillon présente en outre quatre modifications importantes.

a. Une teinte verdâtre fluorescente apparaît dès le premier jour, d'abord en surface, puis dans toute la masse (fig. 172 et 173); elle fonce beaucoup par agitation. Les jours suivants, la teinte passe au vert foncé. Plus tard, elle devient brune.

b. La culture dégage une odeur pénétrante, aromatique, presque caractéristique.

c. Les cultures vieilles (après huit jours) sont très alcalines.

d. Les cultures vieilles sont filantes, visqueuses.

Lait. — Le lait est d'abord coagulé, puis le caillot se redissout. Le milieu prend une teinte verdâtre.

Gélatine. — La gélatine *est liquéfiée*.

En piqures. — A 20°-22°, la liquéfaction commence au deuxième jour et progresse pendant une semaine; elle débute par la surface sous forme de cupule et gagne peu à peu en largeur et en profondeur. Le milieu devient vert autour de la culture.

Sur plaques. — Les colonies isolées sont d'abord petites, jaunâtres, granuleuses (trente-six heures); puis la liquéfaction apparaît et le milieu verdit.

Gélose. — Sur gélose inclinée, la culture est abondante, grisâtre, glaireuse; le milieu présente une fluorescence verte (fig. 174). Les stries de vieilles cultures ont souvent un aspect écailleux.

Pomme de terre. — Il se forme un enduit glaireux, brunâtre. Quand on gratte la culture, la portion mise à l'air devient verte (caméléonage).

Milieux spéciaux pour l'étude des pigments. — Voyez ci-dessous, *Pouvoir chromogène*.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Le Bacille pyocyanique demeure longtemps vivant dans les cultures et dans les milieux extérieurs. Il ne résiste guère aux antiseptiques usuels; la preuve en est que l'application des méthodes antiseptiques a presque fait disparaître le pus bleu. Un chauffage de cinq minutes à 59° détruit le Bacille de Gessard.

Action dénitrifiante. — Le Bacille pyocyanique réduit les nitrates d'abord en nitrites, puis en azote. En bouillon additionné de nitrate de potasse, l'azote se dégage abondamment.

Production de ferments. — Des cultures filtrées ou tuées par

le chloroforme, on peut extraire un ferment qui liquéfie la gélatine, et un autre qui coagule le lait (Bergmann).

Fig. 172 et 173. — Culture de Bacille pyocyanique sur bouillon : à gauche, après un jour ; à droite, après cinq jours.

Fig. 174. — Bacille pyocyanique sur gélose.

Pouvoir chromogène. — Pigments. — La fonction la mieux connue et la plus apparente est la production de pigments.

Milieux d'étude. — Certains milieux sont particulièrement adaptés à l'étude des pigments.

Gessard recommande spécialement les suivants:

a. *Bouillon simple*, produit de décoction de la viande pendant trente minutes, filtré et neutralisé (sans addition de peptone ni de sel).

b. *Eau peptonée*: peptone pancréatique Defresne à 2 p. 100.

c. *Milieu réactif*: c'est le milieu précédent, additionné de 10 p. 100 de glycérine, et solidifié par addition de gélose.

Ces milieux suffisent pour caractériser l'espèce, la variété et la race.

D'autres milieux conviennent pour démonstrations spéciales. Nous les retrouverons plus loin.

Étude des pigments. — Variétés de l'espèce pyocyanique: bacilles pyocyanogène, érythrogène, mélanogène. — Gessard a signalé trois pigments: la *pyocyanine* (pigment bleu), le *pigment vert fluorescent* et le *pigment jaune verdâtre*, non fluorescent, devenant *rouge* par oxydation (au contact de l'air).

Il existe en outre un pigment *brun noir*. Cassin et Troussaint, puis Radais et Gessard ont en effet étudié un Bacille qui, cultivé sur les milieux habituels de production des pigments, donne tout d'abord les pigments normaux du Bacille pyocyanique, puis une teinte brun noir; cette teinte foncée apparaît d'emblée sur pomme de terre (rouge marron) et en lait (noir encre de Chine). Gessard a montré que le pigment noir est dû à l'action de la tyrosinase, sécrétée par le Bacille, sur la tyrosine des milieux. Il fait défaut dans les milieux exempts de tyrosine.

La valeur des divers pigments est très inégale.

Seule, la production de pyocyanine est caractéristique de l'espèce pyocyanique, à qui elle appartient exclusivement.

Le pigment jaune verdâtre et le pigment noir appartiennent à certains échantillons de l'espèce, producteurs en même temps de pyocyanine.

Quant au pigment vert fluorescent, il ne diffère pas de certains pigments sécrétés par d'autres espèces; il n'est donc pas spécial au Bacille pyocyanique.

Se basant sur leurs propriétés pigmentaires, Gessard classe les Bacilles pyocyaniques en trois variétés:

Variété *Pe, pyocyanogène*, productrice de pyocyanine et de pigment jaune rouge, avec prédominance de pyocyanine;

Variété *E, érythrogène*, productrice des mêmes pigments, avec prédominance de pigment jaune rouge;

Variété *M*, *mélanogène*, productrice de pigment noir et de pyocyanine.

En « bouillon simple » de Gessard, les trois variétés *Pe*, *E* et *M* donnent de la pyocyanine et du vert fluorescent; *E* et *M* ne donnent pas leurs pigments spéciaux.

En milieux peptonés :

Pe donne du bleu ou bleu vert, sans fluorescence;

E donne d'abord une teinte jaune verdâtre (pigment jaune verdâtre), qui devient rouge dans la suite. Le pigment bleu n'est pas visible, mais le chloroforme permet d'extraire de la pyocyanine, qui était bien présente, mais voilée par l'autre pigment;

M donne une teinte d'abord brune, puis noire (pigment noir ou mélanique). Ici encore, le chloroforme permet d'extraire de la pyocyanine, voilée par le pigment noir.

De plus l'oxydation transforme deux des pigments précédents : la pyocyanine, en un pigment jaune, la *pyoxanthose* (Fordos); le pigment fluorescent, en pigment feuille morte (Gessard).

La production des pigments dépend beaucoup des milieux. Sur certaines peptones (pauvres en phosphates) et sur gélatine à 10 p. 100 (sans bouillon ni peptone) la pyocyanine apparaît seule. Sur l'albumine de l'œuf (liquide), on obtient seulement le pigment vert fluorescent; sur la gélatine ci-dessus additionnée de 1 p. 100 de glucose, on ne trouve plus que le pigment jaune verdâtre (Gessard).

D'après Gessard, la production de pigment fluorescent est liée à la présence de phosphates (généralement amenés par les albuminoïdes). Dans un milieu minéral comprenant par litre 3 grammes de succinate d'ammoniaque, 2gr,5 de sulfate de magnésie, 5 grammes de phosphate de potasse, la culture est abondante et fluorescente; supprime-t-on le phosphate, la culture reste grêle, mais le milieu est d'un bleu pur.

La *pyocyanine*, soluble dans l'eau et le chloroforme, peut être obtenue des cultures en bouillon. La culture, alcalinisée au préalable par l'ammoniaque, est agitée avec du chloroforme : ce dernier dissout le pigment et devient bleu; le bouillon garde une teinte verte (autres pigments). Il faut éliminer les matières grasses dissoutes; dans ce but, après décantation, le chloroforme est lavé à l'eau acidulée par l'acide chlorhydrique; la pyocyanine, virée au rose par l'acide, est entraînée avec l'eau acidulée, alors que les matières grasses dissoutes ne passent pas. On recueille l'eau chargée de pyocyanine; une alcalinisation par l'ammoniaque fait réapparaître la teinte bleue. On agite enfin l'eau de lavage avec du chloroforme, qui dissout la pyocyanine à peu près pure, et on évapore le chloroforme : après évaporation, il reste de petits cristaux de pyocyanine. On obtient des cristaux plus nets, en aiguilles ou octaèdres, en reprenant par l'eau distillée et laissant évaporer. Outre les réactions qui viennent d'être indiquées (solubilité, action des acides et des alcalis), il faut signaler encore que la pyocyanine

est réduite (décoloration) par les corps réducteurs, mais la teinte bleue réapparaît par oxydation ; c'est le cas des cultures en bouillon, dont la couleur se fonce par agitation.

Le *pigment fluorescent*, insoluble dans le chloroforme, paraît identique au pigment sécrété par un grand nombre de bactéries dites fluorescentes.

Le *pigment jaune verdâtre* est peu connu.

Anomalies et races artificielles. — Dans la nature, on rencontre souvent des microbes qui ne forment pas d'emblée ou ne forment jamais tous les pigments. Répétons-le : seule, la production de pyocyanine est caractéristique du pyocyanique. Elle manque souvent, mais on peut la faire réapparaître en faisant passer par le péritoine du cobaye (Bonjean) ou en cultivant sur le *milieu réactif* de Gessard (Voy. ci-dessus, *Milieux d'études*).

On a réussi à modifier artificiellement l'aptitude chromogène du Bacille pyocyanique. On peut abolir toute propriété par cultures successives en milieux acides (Wasserzug) ou à 72° (Charrin). Gessard distingue la race A, normale, productrice de tous les pigments ; la race F, qui donne seulement le pigment fluorescent, sans pyocyanine ; la race P, qui, inversement, donne seulement la pyocyanine, sans pigment fluorescent ; la race S, qui ne produit aucun pigment. On crée la race P, en cultivant A pendant plus d'un an sur albumine de l'œuf. On crée la race F en chauffant A à 57° pendant cinq minutes, ou en inoculant A au lapin. On crée enfin la race S en traitant E comme il vient d'être dit pour A : chauffage à 58° ou inoculation, ou bien par dégradation spontanée de la race P. Mais toutes ces modifications s'appliquent seulement au « bouillon simple » ou milieux similaires ; *les races E, F et S, repiquées sur milieu réactif, donnent la pyocyanine.*

Antagonisme. — Rumpf a prêté gratuitement au Bacille pyocyanique une action antagoniste à l'égard du Bacille typhique (Voy. chap. XXVII, *Antagonisme à l'égard du charbon*).

Réaction à l'égard des sérums. — C'est en étudiant le Bacille pyocyanique que Charrin et Roger (1889) découvrirent le phénomène de l'*agglutination* : les microbes poussent agglutinés dans le sérum d'animaux immunisés, contrairement à ce qui se passe pour le sérum normal.

Dans les infections humaines à Bacille pyocyanique, l'agglutination est inconstante (Achard, Loeper et Grenet) ; elle peut être positive à 1 p. 100.

ACTION PATHOGÈNE.

Dans les conditions naturelles, chez l'homme. — Le Bacille pyocyanique est tout d'abord l'agent du *pus bleu*, complication peu grave des plaies, devenue rare actuellement.

On le rencontre, en outre, parfois au cours de diverses manifestations pathologiques, spécialement dans les entérites de l'enfance (Escherich), dans la diarrhée de Cochinchine (Calmette), plus rarement dans les méningites, les bronchopneumonies, les otites, etc.

Quelques observations prouvent, en outre, que le Bacille pyocyanique peut déterminer une infection générale, sous forme de septicémie, tantôt pure, tantôt accompagnée de manifestations diverses : bulles ou phlyctènes cutanées, hémorragies, albuminurie, etc.

Le Bacille pyocyanique est parfois associé à d'autres microbes spécifiques, spécialement au Bacille typhique (H. Vincent).

Inoculation expérimentale. — Virulence. — Le Bacille pyocyanique est souvent virulent d'emblée. La virulence peut être exaltée par passages successifs sur l'animal.

Le lapin, le cobaye, le rat et la souris sont réceptifs.

Lapin. — Les effets du Bacille pyocyanique chez le lapin ont été particulièrement étudiés par Charrin. Le lapin résiste le plus souvent aux inoculations pratiquées sous la peau ; la meilleure voie est l'inoculation intraveineuse.

Inoculation intraveineuse. — A dose de 1 centimètre cube, un virus actif provoque la mort en un à trois ou quatre jours, avec fièvre, diarrhée, albuminurie, convulsions, etc. A l'autopsie : Bacilles dans le sang et les organes (reins surtout).

Moins actif, le Bacille pyocyanique amène la mort en plusieurs semaines ou plusieurs mois. Il survient souvent pendant la vie une paralysie spasmodique qui débute par le train postérieur et se généralise ensuite. A l'autopsie, les Bacilles ont disparu ; on constate des lésions diverses, entre autres des infarctus, de la néphrite (petit rein) avec hypertrophie du cœur, de la dégénérescence amyloïde des reins, etc.

Ingestion. — Avec un Bacille provenant d'entérites ulcéreuses de l'homme, Brau a reproduit par ingestion de l'entérite ulcéreuse avec dégénérescence graisseuse du foie.

Cobaye. — Suivant la virulence, l'inoculation sous-cutanée provoque soit une simple lésion locale : tuméfaction, puis suppuration gommeuse et escarre ; soit une septicémie mortelle avec tuméfaction locale. L'inoculation intrapéritonéale, plus sévère, peut déterminer une péritonite mortelle.

Rat et souris. — Aussi réceptifs que les précédents ; mêmes réactions.

TOXINES.

Toxicité des cultures stérilisées. — Les cultures stérilisées par chauffage ou par filtration sont toxiques pour le lapin ; on retrouve les mêmes symptômes qu'après l'inoculation du virus, spécialement les paralysies. Arnaud et Charrin ont dissocié trois groupes de produits toxiques : produits volatils, surtout vasoconstricteurs ; produits insolubles dans l'alcool, provoquant la diarrhée et les hémorragies ; produits solubles dans l'alcool, surtout convulsivants. La pyocyanine n'est pas toxique.

Les cultures anciennes (quarante jours) de virus exaltés, stérilisées par le toluène, sont toxiques pour le cobaye (Wassermann).

Pyocyanolysine. — Les cultures en bouillon de Bacille pyocyanique, même filtrées ou tuées par le toluol ou la chaleur, renferment une lysine (Bulloch et Hunter), active sur les globules de chien, un peu moins sur les hématies du cheval, du cobaye, du lapin, etc. La pyocyanolysine apparaît vers le septième jour ; elle augmente ensuite avec l'âge et se montre surtout abondante vers la troisième ou quatrième semaine, à un moment où les cultures sont très alcalines. Elle est thermostabile ; même un chauffage de trente minutes à 120° ne la détruit pas (Weingeref).

Pyocyanase. — Emmerich et Lœw obtiennent la pyocyanase de la manière suivante : des cultures en bouillon âgées de trois à quatre semaines sont filtrées ; le filtrat, réduit au dixième de son volume primitif par évaporation, est dialysé pendant douze heures ; on précipite le dialysat par l'alcool ; le précipité, redissous dans l'eau, constitue la pyocyanase.

La pyocyanase dissout certaines bactéries (Bacille diphtérique, Bactéridie charbonneuse, Bacille typhique), de même que la fibrine et le blanc d'œuf. Elle peut guérir les animaux inoculés antérieurement de charbon bactéridien ou de toxine diphtérique ; elle est ainsi curatrice, mais n'est pas préventive. Pour la rendre préventive il faut la combiner à une albumine animale (sang et rate broyée) : ce produit est appelé *immun-protéidine-pyocyanase.*

La pyocyanase a été employée dans le traitement de la diphtérie, mais sans grand succès.

SIÈGE.

A l'état normal, le Bacille pyocyanique fait partie de la flore intestinale de l'homme et de diverses espèces animales. On le rencontre également sur la peau (Müsham).

Il est assez fréquent dans les eaux, spécialement dans certaines

régions (Tunisie, d'après Besson) ; il peut exister dans l'air et dans le sol.

A l'état pathologique, on trouve le Bacille pyocyanique dans le pus bleu, comme dans les diverses lésions localisées qu'il provoque. En cas de septicémie, on le trouve dans le sang.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic bactériologique est basé exclusivement sur la constatation du microbe. On pensera au Bacille pyocyanique quand les circonstances cliniques l'indiquent (pus bleu), ou bien quand les cultures présentent une teinte verdâtre ou bleuâtre.

Le microbe sera facilement isolé sur gélose ordinaire ou sur gélatine. On procédera ensuite à son étude ; la recherche des pigments est de première importance. Seule la pyocyanine est caractéristique de l'espèce ; on ne peut appeler Bacille pyocyanique un microbe qui ne donne pas de pyocyanine.

Soupçonne-t-on la nature pyocyanique d'un germe qui ne donne pas primitivement de pyocyanine, on essaiera de faire apparaître cette dernière par cultures successives, ou par inoculation au cobaye, ou de préférence par culture sur le milieu réactif de Gessard.

On ne confondra pas le Bacille pyocyanique avec l'un des nombreux Bacilles fluorescents (Voy. *Analyse des eaux*) ; ces derniers ne donnent pas de pyocyanine.

VACCINATION. — SÉROTHÉRAPIE.

I. On peut vacciner les animaux en inoculant à plusieurs reprises de petites doses soit de cultures vivantes, soit de toxines (Charrin).

II. Le sérum des animaux vaccinés est préventif et curatif (Charrin) ; il est également antitoxique chez les animaux préparés avec la toxine (Wassermann). Il est en outre antipigmentaire : il suffit d'en ajouter une goutte à un tube de bouillon pour empêcher la production de pyocyanine (Charrin et Roger) ; mais l'addition d'un peu de peptone fait réapparaître le pigment (Gheorghiewski).

CHAPITRE XXVI

BACILLES ENCAPSULÉS. — PNEUMOBACILLE

Sous le nom de « Bacilles encapsulés », on désigne un groupe de microbes dont les caractéristiques communes sont les suivantes : ce sont des Bacilles polymorphes, capsulés, immobiles, ne prenant pas le Gram ; leurs cultures sur milieux solides sont abondantes et visqueuses, leur culture en piqûre sur gélatine présente une forme particulière, en clou ; ils ne donnent pas d'indol.

L'espèce la plus importante du groupe est le *Pneumobacille de Friedländer* ; il faut citer en outre le *Bacillus lactis aerogenes* et le *Bacille du rhinosclérome*.

Ces microbes sont-ils identiques ou faut-il les distinguer les uns des autres ? La question est discutée.

I. Il est tout d'abord établi que le Bacille considéré par Lœwenberg, puis Abel, comme étant l'agent spécifique de l'ozène, est absolument identique au Pneumobacille. Le *Bacillus ozenæ* Lœwenberg doit donc disparaître.

II. Les Bacilles encapsulés ne peuvent être séparés nettement d'après leurs propriétés pathogènes. Le Bacille du rhinosclérome est généralement avirulent pour l'animal, alors que les deux autres sont souvent virulents ; mais il y a nombre d'exceptions dans les deux sens.

III. Les recherches sur les propriétés spécifiques des sérums ont abouti à des résultats peu concordants. L'opinion la plus générale peut être exprimée ainsi : devant les sérums spécifiques, le Bacille du rhinosclérome paraît se séparer du Pneumobacille (Goldzieher et Neuber) ; le *B. lactis aerogenes*, au contraire, se rapproche beaucoup de ce dernier (Bertarelli). Cette formule s'applique aussi bien aux agglutinines qu'aux sensibilisatrices.

IV. L'action fermentative sur les sucres est variable suivant les échantillons : le *B. lactis aerogenes* et, à un moindre degré, le Pneumobacille, fermentent fortement la glucose, moins fortement la lactose et la saccharose ; le Bacille du rhinosclérome fermente peu ou pas ces mêmes sucres.

V. On peut accepter provisoirement la classification de Bertarelli, très voisine de celle proposée antérieurement par Clairmont. Bertarelli divise les Bacilles encapsulés en deux groupes :

1° *Groupe du B. lactis aerogenes*, avec deux espèces : Pneumobacille de Friedländer et *B. lactis aerogenes*. Ces Bacilles sont assez souvent virulents pour l'animal ; ils fermentent la plupart des sucres ; leur inoculation aux animaux fait apparaître dans le sérum des anticorps, agglutinines et sensibilisatrices, actifs sur les deux espèces (plus actifs sur l'espèce inoculée).

2° *Groupe du B. mucosus capsulatus*, avec deux espèces : Bacille du

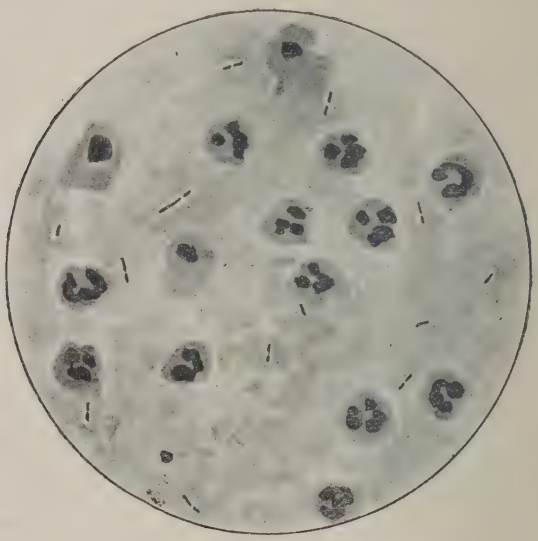

Fig. 175. — Crachats de pneumonie à Pneumobacilles.

rhinosclérome et *B. mucosus capsulatus*. Ces deux espèces sont peu ou pas virulentes ; elles fermentent peu les sucres ; elles sont difficilement agglutinables et, d'autre part, ne se prêtent pas à l'obtention de sérums de quelque activité.

PNEUMOBACILLE.

Friedländer, qui découvrit le Pneumobacille (1882), le considéra tout d'abord comme l'agent spécifique de la pneumonie lobaire ; l'erreur fut vite reconnue, au profit du Pneumocoque. Les recherches

ultérieures, en particulier celles de Netter, ont élucidé le rôle vrai du Pneumobacille, agent assez fréquent de certaines affections pleuro-pulmonaires, méningées, etc.

MORPHOLOGIE.

Caractères microscopiques. — Dans les organes ou produits pathologiques (fig. 175), le Pneumobacille se présente sous forme de bacilles ou de cocco-bacilles, de taille inégale, en moyenne

Fig. 176. — Pneumobacille (culture en bouillon).

1 μ,5, assez trapus, entourés d'une capsule très nette. Les éléments sont le plus souvent isolés ou placés deux bout à bout.

En cultures, l'aspect est polymorphe; les bâtonnets dominent, mélangés à des formes plus courtes ou plus allongées (fig. 176). La capsule existe seulement sur milieux albumineux; elle manque sur les autres milieux. Grimbert signale pourtant une auréole très nette même sur gélose et bouillon.

Coloration. — Le Pneumobacille se colore facilement. *Il ne prend pas le Gram.* Les capsules se colorent très facilement par les procédés décrits chap. XV.

Mobilité. — Spores. — Immobile. Ne donne pas de spores.

CULTURES.

Conditions générales. — Le Pneumobacille se développe très facilement sur les milieux habituels, même à la température ambiante. Il est anaérobie facultatif.

Fig. 177. — Pneumobacille. Culture en piqûre en gélatine (culture en clou).

Gélatine. — Le milieu *n'est pas liquéfié.*

En piqures (fig. 178). — On obtient la *culture en clou*, presque caractéristique : dès le deuxième jour, disque bombé, blanc-porcelaine, à la surface ; mince traînée blanche en profondeur. Il se dégage parfois quelques bulles gazeuses.

Sur plaques. — Au deuxième jour, en surface, colonies blanches, saillantes, rondes; en profondeur, colonies blanc jaunâtre.

En strie. — Enduit blanc-porcelaine, épais, muqueux; l'enduit peut glisser en partie au fond du tube.

Gélose. — Culture abondante, blanche, visqueuse.

Sérum coagulé. — Culture visqueuse, blanc grisâtre.

Pomme de terre. — La culture est luxuriante sous forme d'enduit épais, visqueux, blanc jaunâtre, souvent soulevé par de grosses bulles gazeuses.

Bouillon. — Trouble uniforme au début, avec collerette à la surface. Dans la suite, il se forme au fond un dépôt ; le bouillon devient parfois visqueux.

Sérum liquide de lapin. — Culture abondante ; diplocoque-bacilles capsulés (Bezançon et Griffon).

Lait. — Les caractères de culture sur le lait sont certainement variables. D'après Grimbert, le lait est toujours coagulé, mais parfois tardivement (treize jours) ; d'après Clairmont et d'autres auteurs, le lait n'est pas coagulé. Denys et Martin avancent que certains échantillons ne coagulent le lait qu'après plusieurs cultures sur ce milieu, résultat contesté par Clairmont. En fait, on trouve des Pneumobacilles qui coagulent et d'autres qui ne coagulent pas.

Lait tournesolé. — Vire au rouge en un ou plusieurs jours.

Petit-lait tournesolé. — Devient légèrement rouge.

Milieux sucrés. — Le Pneumobacille fermente la plupart des sucres (Voy. *Propriétés biologiques*). Grimbert recommande pour l'étude chimique le milieu suivant : sucre, 3 grammes ; peptone 2 grammes ; eau, quantité suffisante pour 100 centimètres cubes ; carbonate de chaux, quantité suffisante. On peut employer les milieux sucrés indiqués ailleurs.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Réactions biochimiques. — Action sur les sucres. — La plupart des échantillons de Pneumobacille fermentent presque tous les sucres: saccharose, maltose, lactose, glucose, mannite, dulcite, glycérine, etc. ; seule l'érythrite n'est pas attaquée. Certains échantillons toutefois ne fermentent pas la dulcite (Grimbert) ; d'autres ne fermentent ni la dulcite, ni la glycérine (Frankland).

Les produits formés sont variables suivant les sucres : alcool et acide acétique presque toujours, plus acide lactique gauche pour la glucose, acide succinique pour la maltose, etc. (Grimbert).

Absence de formation d'indol. — Le Pneumobacille ne forme pas d'indol.

Réactions à l'égard des sérums. — D'après Bertarelli, le sérum d'animaux inoculés avec le Pneumobacille présente une agglutinine et une sensibilisatrice spécifiques.

ACTION PATHOGÈNE.

Dans les conditions naturelles, chez l'homme. — Le Pneumobacille provoque diverses manifestations pathologiques : pleurésies purulentes, bronchopneumonies (Netter), péricardites, endocardites, abcès superficiels ou profonds, méningites, otites, parotidites, angines tenaces à fausses membranes (Ch. Nicolle et Hébert), cystites, etc. Lœwenberg décrit comme agent habituel de l'ozène un microbe qui ne diffère en rien du Pneumobacille.

Le Pneumobacille provoque aussi, mais bien rarement, des infections généralisées (Netter, Lemierre).

Il intervient parfois comme agent d'infection secondaire, spécialement au cours de la pneumonie franche, dont il aggrave le pronostic.

Inoculation expérimentale. — Virulence. — La virulence du Pneumobacille est très variable, parfois nulle, parfois considérable. Il y a, en outre, des variations qualitatives, le Pneumobacille

se montrant pathogène seulement chez l'une ou l'autre des espèces sensibles (Nicolle et Remlinger). La souris, puis le cobaye sont en général le plus sensibles; le lapin et le pigeon, un peu moins.

Souris. — Suivant la virulence, l'inoculation sous-cutanée provoque un simple abcès local à pus visqueux, ou bien l'infection se généralise et l'animal meurt de septicémie.

Friedländer a reproduit l'hépatisation par injection dans le poumon.

Cobaye. — L'injection sous-cutanée détermine parfois une septicémie mortelle en vingt-quatre heures avec hémorragie des capsules surrénales (Roger); le plus souvent, un abcès local, qui peut être suivi de bronchopneumonie mortelle.

Lapin. — Le lapin n'est pas réfractaire, contrairement à ce qu'on avait d'abord pensé. L'inoculation intraveineuse (1 à 2 centimètres cubes) entraîne tantôt une septicémie simple ; tantôt une septicémie hémorragique avec purpura intestinal, infarctus des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques; tantôt une infection chronique (Roger).

Pigeon. — Parfois sensible à l'injection intrapéritonéale.

Toxines. — Les cultures filtrées, injectées dans le péritoine du lapin, sont toxiques et peuvent déterminer des hémorragies intestinales (Denys et Martin).

SIÈGE.

Chez l'homme. — *A l'état normal*, le Pneumobacille se rencontre fréquemment dans la bouche (Netter, Bezançon et Griffon), parfois dans le nez et les bronches.

A l'état pathologique, le Pneumobacille existe dans toutes les lésions localisées qu'il provoque (Voy. ci-dessus), parfois dans le sang.

Dans les milieux extérieurs. — Le Pneumobacille peut être décelé dans l'eau (Besson, Grimbert), plus rarement dans le sol (Jakowski), l'air, les poussières (Emmerich). C'est un microbe assez répandu dans la nature.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

Le diagnostic de l'infection repose sur la constatation du Bacille. il est facile de le déceler, mais il est parfois moins facile de l'identifier.

Recherche du microbe. — *a.* L'examen direct des produits

pathologiques (crachats, pus, sérosités après centrifugation, fausses membranes) donnera des indications précieuses : Bacilles capsulés ne prenant pas le Gram.

b. L'isolement sera facilement obtenu sur sérum coagulé (fausses membranes), sur gélose ou gélatine (pus). Pour les crachats, l'isolement par cultures est généralement facile ; il est toutefois souvent plus expéditif d'inoculer à la souris et, après la mort, d'examiner et ensemencer le sang.

c. La recherche dans le sang sera faite comme d'ordinaire (voir : *analyses bactériologiques appliquées à la clinique*).

d. Pour les eaux, employer les bouillons phéniqués (voir : *analyse des eaux*). Pratiquer ensuite l'isolement sur milieux solides.

Identification. — Dans tous les cas, qu'il s'agisse de crachats, de pus, de sang ou d'eaux, l'identification sera faite sur des colonies *rigoureusement isolées*. On vérifiera les caractères morphologiques, culturaux et biologiques décrits ci-dessus. La capsule sera mise en évidence par culture en sérum (de préférence, sérum de lapin ou ascite) ou dans le sang et les organes des animaux inoculés.

Le Pneumobacille ne peut être confondu qu'avec certains Colibacilles atypiques, ne donnant pas d'indol et tout à fait immobiles. Certains auteurs voudraient même faire rentrer le Pneumobacille dans le cadre des Colibacilles atypiques.

Les seuls caractères différentiels sont : pour le Pneumobacille, la présence de capsules, l'absence de cils, l'exubérance et la viscosité des cultures sur gélatine, gélose et pomme de terre ; pour le Colibacille, l'absence de capsules, la présence de cils, le moindre développement sur les milieux précités.

La confusion avec le Pneumocoque est inadmissible.

BACILLUS LACTIS AEROGENES.

Ce microbe est certainement très voisin du Pneumobacille ; Grimbert et Legros, Denys et Martin concluent même de leurs recherches que les deux microbes sont identiques. On ne relève entre eux que des différences de détail : le *B. lactis aerogenes* est capsulé dans le sang et le pus, mais non dans les milieux artificiels ; il coagule toujours le lait en un à cinq jours (il est d'ailleurs l'un des « ferments lactiques », microbes qui provoquent la coagulation spontanée du lait) ; il fermente les mêmes sucres que le Pneumobacille, sauf la dulcite. Les autres caractères morphologiques, culturaux et biologiques sont exactement ceux du Pneumobacille.

Le *B. lactis aerogenes* est pathogène expérimentalement, par injection intrapéritonéale, pour le lapin, la souris, le cobaye : péritonite et septicémie. Il fait partie de la flore normale de l'intestin et se rencontre assez souvent dans les eaux. On lui a attribué un rôle dans l'étiologie des entérites infantiles.

BACILLE DU RHINOSCLÉROME.

Dans le rhinosclérome, maladie presque spéciale à l'Amérique centrale et aux rives du Danube, et surtout caractérisée par un épaississement chondroïde des muqueuses naso-labio-pharyngées, l'examen direct, les coupes et les cultures permettent de reconnaître un microbe particulier, dit *Bacille de Frisch*, très voisin du Pneumobacille. Dans les tissus, ce Bacille est capsulé ; il siège soit en dehors des cellules, soit dans les globules blancs, soit dans de grandes cellules (20 μ et plus), sphéroïdales, à protoplasma réticulé, renfermant parfois dix à trente Bacilles et beaucoup plus (Cornil et Alvarez), dites cellules de Mikulicz. En cultures, faciles à obtenir, le Bacille présente les caractères du Pneumobacille, dont il paraît se distinguer par son développement moins luxuriant sur tous les milieux, l'absence de fermentation des sucres, le bleuissement du petit-lait tournesolé et la non-coagulation du lait ; la capsule persiste, dit-on, sur les milieux de culture, sauf le bouillon, particularité que nous n'avons pas constatée. Ces caractères, de même que les réactions à l'égard des sérums, semblent permettre de conserver au Bacille de Frisch son individualité, sans le confondre avec le Pneumobacille. Les effets pathogènes sont inconstants, généralement faibles.

Le sérum des malades atteints renferme une sensibilisatrice spécifique pour le Bacille de Frisch (Goldzieher et Neuber).

Le rôle spécifique du Bacille de Frisch est généralement admis, mais certains auteurs le contestent (Babès, Perkins).

BACILLUS CAPSULATUS MUCOSUS.

Ce nom a été appliqué à divers microbes, présentant les caractères généraux des Bacilles encapsulés. Le plus connu est le *B. mucosus capsulatus* de Fasching, isolé par cet auteur au cours de la pandémie grippale de 1890. Le Bacille de Fasching présente l'ensemble des caractères du B. du rhinosclérome, dont il ne diffère que par sa virulence pour les animaux.

CHAPITRE XXVII

BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

La bactéridie charbonneuse a été découverte par Rayer et Davaine en 1850 dans le sang de mouton mort du charbon.

Pollender retrouve en 1855 ce même agent figuré dans le sang de vaches charbonneuses. En 1855, Brauell, en face de ce même germe, le confond avec les germes de la putréfaction. En 1860, Delafond le différencie de ces derniers, mais n'ose affirmer qu'il est spécifique de la maladie charbonneuse.

En 1863, Davaine reprend les faits qu'il avait déjà constatés treize ans auparavant, affirme la constance des bâtonnets en question dans le sang de tout animal atteint de charbon. Frappé des analogies existant entre ces corps et les vibrions mis en évidence par Pasteur dans la production de la fermentation butyrique et s'appuyant sur les résultats de l'expérimentation, il affirme son rôle spécifique dans l'étiologie du charbon; il le baptise « bactéridie charbonneuse ».

En 1876, Koch en fait l'histoire naturelle, l'obtient en culture en sérum sanguin et dans l'humeur aqueuse du bœuf; il étudie son développement et décrit les spores charbonneuses, les conditions de leur production.

Enfin, Pasteur et ses élèves Joubert, Roux et Chamberland, prouvent le pouvoir pathogène spécifique de la bactéridie en reproduisant, chez l'animal inoculé avec les cultures, l'infection charbonneuse. Ils font connaître ensuite les points essentiels de l'étiologie du charbon. Toute cette belle série de travaux devait aboutir à sa prophylaxie par les vaccinations basées sur le grand principe de l'atténuation des virus.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — *Dans l'organisme.* — On découvre la bactéridie charbonneuse dans le sang et les viscères. Examiné à l'*état frais*, le sang montre des bâtonnets rectilignes, flexibles et immobiles, longs de 5 à 6 μ sur 1 μ, 5 de largeur : ils sont isolés, ou groupés en chaînettes formées de deux à trois éléments semblables, séparés par un intervalle souvent imperceptible, ce qui leur donne l'apparence d'un long filament continu. Enfin, autour de chaque bâtonnet, une zone claire est décelable, constituant comme une capsule.

A l'état sec après coloration, ces bâtonnets présentent le même

aspect général, mais leurs extrémités sont coupées net (fig. 178); cependant de forts grossissements montrent que la coupure est en réalité sinueuse. Ce détail permettrait de ne pas confondre la bactéridie charbonneuse avec des germes similaires. Enfin, en certains cas, les extrémités de la bactéridie sont un peu renflées; quand plusieurs d'entre elles sont situées bout à bout, leur ensemble figure assez bien une tige de bambou.

Dans l'organisme, la bactéridie charbonneuse ne forme jamais

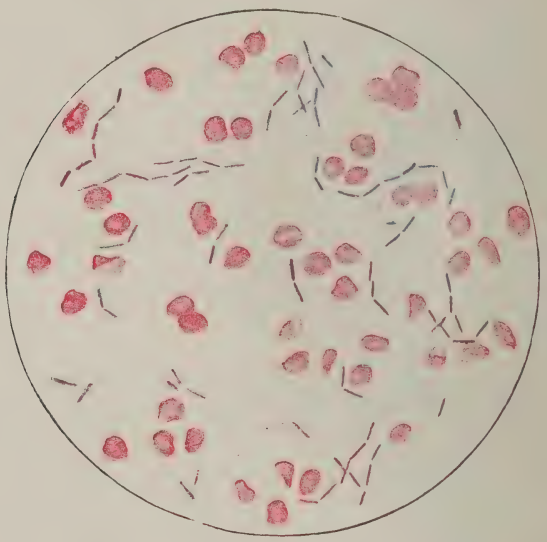

Fig. 178. — Sang de lapin charbonneux (coloration par le Gram composé).

de spores. Observée dans l'humeur aqueuse, en goutte suspendue, elle se reproduit nettement par scissiparité.

Dans les cultures. — Dans les milieux de cultures, liquides de préférence, la bactéridie charbonneuse prend l'aspect de longs filaments, flexueux, onduleux, enchevêtrés les uns dans les autres. Ils sont immobiles. Une fois colorés, ils sont en réalité constitués par de véritables chaînes de bâtonnets placés bout à bout, tous égaux les uns aux autres, un peu plus courts que dans l'organisme, séparés par une cloison transversale.

Dans les cultures, et dans les conditions qui seront envisagées plus loin, la bactéridie donne naissance à des spores (fig. 179).

Coloration. — Toutes les couleurs d'aniline conviennent pour la coloration de la bactéridie. La thionine phéniquée, le violet de gentiane, la fuchsine de Ziehl sont les plus employés. *Elle prend nettement le Gram.*

Les capsules se colorent aisément par les procédés utilisés à cet effet, notamment par le violet ou la fuchsine acétisés.

Spores. — *Conditions de la sporulation.* — Les spores ne se forment que si la bactéridie se trouve en contact avec l'oxygène

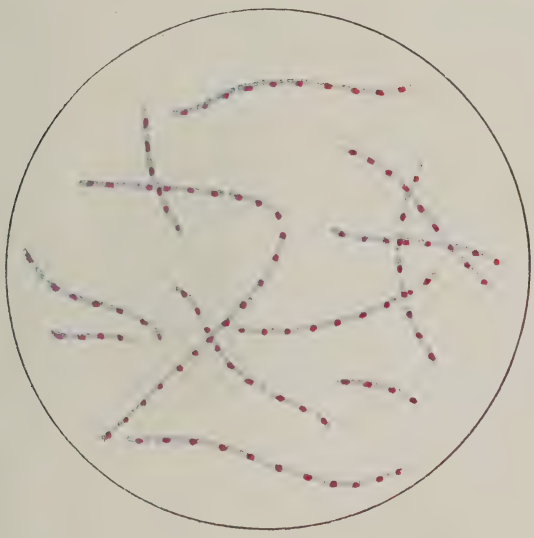

Fig. 179. — Bactéridie charbonneuse sporulée. Coloration des spores.

libre. En son absence, ou en présence d'oxygène combiné (hémoglobine oxygénée), elles ne peuvent prendre naissance. Aussi n'en découvre-t-on pas dans les bactéries observées sur le vivant; elles ne se produisent pas davantage sur le cadavre, car les bactéries anaérobies de la putréfaction absorbent l'oxygène; mais, dès que le cadavre est ouvert, l'air y pénètre et la sporulation s'effectue.

Dans les cultures, au contraire, ou dans les produits pathologiques répandus au dehors du vivant ou du cadavre (urines sanglantes par exemple), les spores ne tardent pas à apparaître.

Enfin le produit contenant les bactéries doit être maintenu entre 18° et 41°,5. A 42°, les spores ne se forment plus. Buchner a obtenu

rapidement la sporulation en cultivant la bactéridie sur gélose sans peptone (gélose de Buchner).

La spore charbonneuse se montre sous l'aspect de grains ovoïdes réfringents, occupant l'intérieur des bâtonnets sans les déformer.

Dans les cultures un peu âgées, la spore devient libre par suite de la désagrégation du bâtonnet, qui a présenté préalablement des formes involutives en massue, poire, boule, etc. La spore ne change d'aspect que si elle est transportée dans un milieu nutritif neuf, en présence d'oxygène libre. Après trois à quatre heures, elle commence à germer : autour de la spore se forme une auréole claire, hyaline; puis la masse centrale s'allonge pour devenir bâtonnet. Chaque élément bactéridien ne produit qu'une spore.

Coloration des spores. — Les spores charbonneuses se colorent par les procédés généraux de coloration de ces organismes spéciaux (fig. 179).

Cultures asporogènes. — Certaines conditions imposées aux cultures permettent d'obtenir des bactéridies asporulées, perdant l'habitude de former des spores, et se multipliant uniquement par scissiparité.

On connaît ainsi le *procédé de Roux*, qui additionne des tubes de bouillon d'acide phénique en quantité telle que le développement de la bactéridie puisse s'effectuer. Le plus souvent, la culture est asporogène. Réensemencée en milieux neufs ordinaires, elle est définitivement asporogène.

Le procédé de Roux et Chamberland, au bichromate de potasse, donne des résultats moins constants.

Pasteur avait observé le fait dans les vieilles cultures en gélatine.

Phisalix, en cultivant la bactéridie en sacs de collodion dans le péritoine du chien, a obtenu une même variété sans spores, mais les bactéridies étaient courtes, ovoïdes, présentant beaucoup d'analogie avec des cocci.

CULTURES.

La bactéridie charbonneuse pousse facilement dans tous les milieux usuels. Sur certains d'entre eux, elle donne un aspect caractéristique.

Le développement ne s'effectue qu'en présence de l'oxygène; c'est donc un microbe *aérobie vrai.* L'oxygène tue les bâtonnets, mais respecte les spores. La multiplication commence à 24° et se termine à 44°. La température optima égale 35° à 37°.

Bouillon ordinaire. — Au bout de vingt-quatre heures, des flocons blancs se forment à la surface du liquide et contre les

parois du tube. Entre eux le bouillon reste limpide. Après quelques jours, ils tombent au fond, où ils constituent un sédiment blanchâtre qui, après la désagrégation des bâtonnets, n'est plus constitué que par des spores.

Gélatine. — *Colonies isolées.* — A la température de 20°, déjà après vingt-quatre heures, apparaissent de petites colonies blanc grisâtre, qui, vues au microscope, sont granuleuses, de teinte jaunâtre, à bords sinueux. Après trente-six heures environ, elles sont plus développées et ressemblent à un *peloton de fil emmêlé.* Après trois à quatre jours, l'aspect change encore : elles figurent assez bien un amas de *filaments ondulés* ou de *cheveux bouclés.* Puis la gélatine se liquéfie sur leur pourtour; ces colonies commencent à se désagréger et ne sont plus représentées que par des flocons nageant dans le liquide formé.

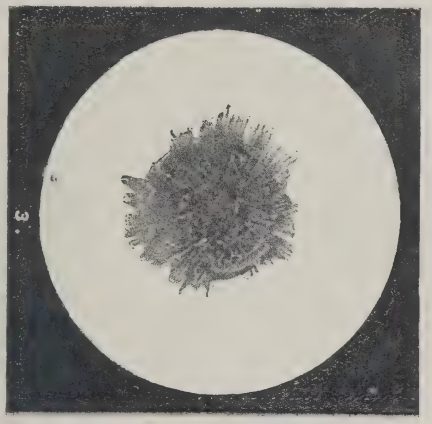

Fig. 180. — Aspect microscopique d'une colonie jeune sur gélatine (Macé).

En piqûre. — En vingt-quatre à trente-six heures, on perçoit, au niveau du trait d'ensemencement, une ligne blanchâtre sur laquelle, au bout du deuxième jour, s'insèrent perpendiculairement des filaments très ténus, d'aspect duveteux (fig. 181). Ces filaments grandissent et envahissent progressivement toute l'épaisseur du milieu. A la surface se développe et s'étale une colonie blanchâtre sans caractère spécial.

Puis, vers le dixième jour, la partie supérieure de la gélatine se liquéfie; la liquéfaction envahit peu à peu la profondeur, et, dans la gélatine liquéfiée, nagent des flocons blanchâtres, qui viennent se sédimenter au fond du tube.

Gélose. — Culture peu caractéristique. En surface inclinée, se développe en vingt-quatre heures une strie assez épaisse, devenant plus étendue, plus sèche et friable, avec des bords dentelés.

Sérum coagulé. — La strie est blanchâtre et liquéfie le milieu; des flocons enchevêtrés prennent naissance, se sédimentant ensuite.

Pomme de terre. — Enduit blanchâtre, épais, opaque, devenant brunâtre dans la suite.

Lait. — Dans les tubes, une coagulation énergique s'effectue vers le deuxième ou troisième jour; le liquide surnageant, clair, incolore, est très alcalin.

En ballon, après quelques jours d'étuve, le milieu est limpide et devient jaunâtre; pas de coagulation, mais les matières grasses se réunissent à la surface, surnageant au-dessus du petit-lait.

Ces différences tiennent, d'après H. Roger, à ce qu'en présence d'une plus grande quantité d'oxygène dans les ballons, un ferment spécial consommerait la caséine avant que la coagulation ait le temps de se produire.

Humeur aqueuse. — Dans l'humeur aqueuse, très pauvre en matériaux nutritifs, la bactéridie prend une forme filamenteuse très longue. Les spores se forment après quarante-huit heures.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Résistance. — La vitalité de la bactéridie charbonneuse varie suivant qu'on l'observe à l'état de bâtonnets ou de spores, ces dernières étant infiniment plus résistantes aux influences extérieures.

D'après Roux et Chamberland, la bactéridie proprement dite succombe, dans les cultures ou le sang frais, à une température de 55° pendant quarante minutes, de 50° pendant une heure; en deux à quatre minutes, une température de 75° les tue; une minute à 80° suffit pour obtenir le même résultat. Les températures très basses (—100°) n'influent en rien sur la vitalité ni sur la virulence.

Les spores, au contraire, supportent pendant dix minutes environ la chaleur humide à 95°; à 100°, elles résistent pendant trois à quatre minutes. A 120° en chaleur sèche, elles résistent souvent durant plusieurs heures. Desséchées dans un milieu albumineux comme le sang, leur résistance est grande.

Les bâtonnets sont sensibles à la *lumière solaire*, qui, en dix à seize heures, a raison de leur vitalité, s'ils se trouvent en présence de l'oxygène. S'ils sont à l'abri de ce gaz, ils peuvent résister jusqu'à quatre-vingt-trois jours (Roux). L'action de la lumière solaire sur les spores est mal connue; elle semble peu marquée.

La dessiccation est peu efficace vis-à-vis des bâtonnets; dans le sang desséché, la bactéridie résiste pendant soixante jours à la température ordinaire; sur la spore, la dessiccation reste sans effet.

Les bâtonnets résistent peu à l'influence des *antiseptiques* ; les spores, au contraire, présentent une résistance considérable ; elles

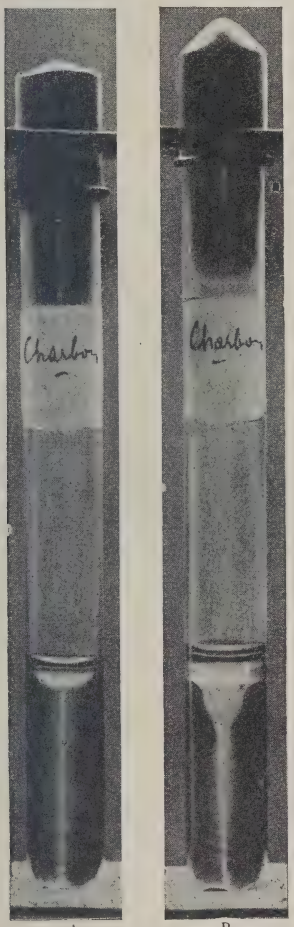

Fig. 181. — Culture de charbon en gélatine. A, deuxième jour ; B, dixième jour.

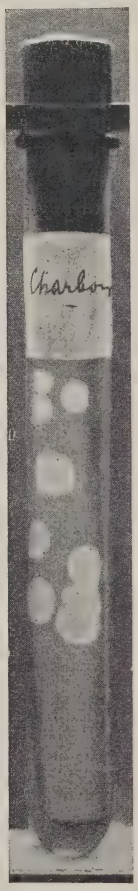

Fig. 182. — Culture de bactéridie charbonneuse sur gélose.

supportent l'action du sublimé à 1 p. 1 000 pendant deux à trois jours, mais, à cet égard, il existe des différences assez notables suivant l'origine de la bactéridie.

Dans le sol, les spores se conservent très longtemps dans les couches profondes, à l'abri de l'air et de la lumière.

Dans l'eau, la spore résiste plus d'un an ; sous l'influence de la *putréfaction*, le bâtonnet se détruit rapidement, alors que la spore reste intacte.

Enfin, *in vitro* et *in vivo*, certaines bactéries possèdent une *action antagoniste* manifeste vis-à-vis du Bacille du charbon. C'est le cas du Bacille pyocyanique, qui semble agir par la pyocyanase qu'il développe, de même aussi le Pneumobacille, le Streptocoque, puis le Staphylocoque, mais dans une mesure plus limitée.

Behring, puis Metchnikoff et Roux ont signalé encore le pouvoir bactéricide du sérum de rat, qui dissout la bactéridie charbonneuse.

Virulence. — Ses modifications expérimentales. — Quand la bactéridie provient du cadavre d'un animal mort de charbon, sa virulence est assez fixe. Elle le doit en grande partie à la présence des spores qui fixent héréditairement la virulence au degré où elle se trouvait dans le tissu d'origine.

Si toutefois on empêche la sporulation, la virulence s'atténue progressivement. Ainsi, quand on conserve une culture à l'étuve à 42°,5, les spores ne se forment pas, et la virulence diminue progressivement, au fur et à mesure des divers ensemencements dans les mêmes conditions : après une vingtaine de jours, une bactéridie ainsi traitée, qui, au début, pouvait tuer le mouton, devient petit à petit incapable de tuer le lapin, puis le cobaye, puis la souris.

Si on ensemence la même culture atténuée en bouillon à 37°, les spores se forment et fixent la virulence au degré obtenu en dernier lieu. C'est ce procédé d'atténuation du virus charbonneux et de fixation de la virulence qui a servi à Pasteur pour les vaccinations qui seront étudiées plus loin.

On peut faire récupérer le pouvoir virulent à une bactéridie qui l'a perdu, en lui faisant subir plusieurs passages par des animaux de plus en plus résistants. Ainsi, à une souris naissante, on inocule une culture incapable de tuer une souris adulte ; elle succombe en deux ou trois jours ; on en prélève le sang, qu'on inocule à une souris âgée de trois jours : elle succombe, et son sang est inoculé à une souris de six jours.

Le sang de cette deuxième, inoculé à une souris adulte, pourra la tuer : la bactéridie provenant de cette dernière expérience tuera un cobaye et, ainsi de suite, tuera un lapin, puis un mouton, etc.

Formation de produits chimiques. — Toxine charbonneuse. — Dans les cultures, la bactéridie charbonneuse transforme la matière albuminoïde en ammoniaque. Maumus a observé la transformation de l'amidon en glucose. D'après de Napias, elle présenterait des propriétés amylolytiques.

Des produits toxiques ont été mis en évidence par plusieurs auteurs :

En précipitant les cultures par l'alcool, Hankin a isolé une albumose très toxique pour l'animal. Avec Wesbroock, il aurait extrait des cultures une diastase, décomposant les matières protéiques avec production d'albumoses. Ces albumoses ont été retrouvées par S. Martin.

Brieger et Fraenkel ont isolé une albuminoïde qui, à l'état sec, est soluble dans l'eau et douée de toxicité.

Procédé Marmier. — Marmier, en 1895, a obtenu encore une substance très toxique, en cultivant la bactéridie en eau peptonisée glycérinée :

Eau	1 000 cent. cubes.
Peptone purifiée	40 grammes.
Sel marin	15 —
Phosphate de soude	0gr,50
Phosphate de potasse	0gr,20
Glycérine pure	40 grammes.

On ensemence la bactéridie charbonneuse en ballons contenant 250 centimètres cubes de ce milieu, stérilisé à 115°. On porte à l'étuve à 37° pendant quarante-huit heures et à 20° pendant quinze jours.

Filtrer sur bougie de porcelaine, saturer de sulfate d'ammoniaque ; un précipité se forme. Filtrer sur papier pour retenir le précipité, qu'on lave avec une solution de sulfate d'ammoniaque à saturation. Traiter le précipité recueilli par une petite quantité de glycérine. Décanter après quarante-huit heures de contact, et additionner à nouveau de glycérine neuve, que l'on décante encore. Mélanger les liqueurs glycérinées et ajouter leur poids d'alcool. Laver le précipité obtenu par l'alcool absolu, puis l'éther. Enfin dessécher dans le vide.

Le produit obtenu est une poudre amorphe, brunâtre, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme. Cette substance, étrangère aux albuminoïdes, alcaloïdes et peptones, est très toxique : inoculée au lapin, elle peut, à faible dose, tuer cet animal ; le cobaye, la souris y sont sensibles.

Ce qui peut faire supposer que le produit obtenu par Marmier est bien la toxine charbonneuse, c'est que les animaux réfractaires à la bactéridie vivante sont réfractaires à l'action de cette substance ; d'autre part, un lapin vacciné contre la bactéridie résiste à l'inoculation de la toxine.

Marmier a pu encore obtenir la même toxine en partant des cultures sur gélose :

On racle une culture sur agar, âgée de quarante-huit heures ; on la laisse macérer dans de l'alcool à 20° ; vingt-quatre heures après, filtrer et pré-

citer le filtrat par l'alcool absolu ; laver le précipité obtenu par l'alcool absolu, puis l'éther. Dessécher dans le vide. On obtient ainsi une poudre présentant les mêmes caractères que précédemment.

Procédé de Boidin. — Boidin a obtenu des produits toxiques en traitant des cultures de charbon par les procédés qu'Auclair avait utilisés pour le bacille tuberculeux. Il a ainsi préparé des extraits éthérés et chloroformés ; dans ce but : filtrer sur papier des cultures en eau peptonée, vivantes ou tuées par la chaleur ; immerger ce filtre dans l'éther ou le chloroforme ; filtrer ensuite ce liquide sur bougie et distiller enfin l'éther ou le chloroforme, qui ont dissous les matières grasses de ces microbes. Ces dernières restent dans le récipient ayant contenu les dissolvants.

L'extrait éthéré est visqueux et dégage une odeur résineuse. L'extrait chloroformé dégage une odeur rappelant celle du saindoux rance. Tous deux ont les réactions des graisses. Ils ne sont ni solubles, ni émulsionnables dans l'eau, sont solubles au contraire dans les alcalis et les huiles. On les émulsionne dans les alcalis en ajoutant une goutte de soude au tiers à $0^{gr},01$ ou $0^{gr},04$ d'extrait.

En injectant ces extraits non solubilisés sous la peau d'animaux divers (singes, lapins, chiens, etc.), Boidin a pu reproduire l'œdème malin comme on l'observe en inoculant les cultures vivantes ou tuées. En pratiquant des injections trachéales, il a observé les mêmes désordres qu'avec les bactéridies. Les matières grasses extraites contiennent donc des poisons à action locale spécifique. Ils supportent sans dommage la température de 100°.

En injectant les extraits solubilisés par addition d'huile, il n'a pas reproduit d'accident local, mais des troubles généraux consistant en amaigrissement progressif, inappétence, cachexie aboutissant à la mort dans un délai de douze heures à vingt-huit jours.

Réactions vis-à-vis de l'antisérum. — ***Agglutination.*** — L'agglutination de cultures homogènes (cultures du premier vaccin) peut s'observer avec le sérum de sujets charbonneux à 1 p. 10 et 1 p. 50. Mais les sérums humains et animaux normaux possèdent le même pouvoir. Cette agglutination n'est donc pas spécifique et ne peut servir au diagnostic (Lambolle et Maréchal, Sobernheim, Guillain, Boidin et N. Fiessinger).

Fixation du complément. — Bordet et Gengou ont montré, par la fixation du complément, que le sérum des cobayes immunisés avec le premier vaccin contenait des ambocepteurs spécifiques pour la bactéridie charbonneuse. Ils les ont décelés dans le sérum anticharbonneux de Sclavo ; Guillain, Boidin et N. Fiessinger, dans le sérum d'un malade atteint d'œdème charbonneux de la face.

POUVOIR PATHOGÈNE.

Charbon spontané.

Chez l'homme. — Le charbon prend, chez l'homme, des formes différentes suivant la voie de pénétration du virus. Le plus souvent

il se manifeste sous forme de pustule *maligne* et d'œdème *malin*, survenant à la suite d'une inoculation cutanée. Ces lésions se déclarent quand une plaie, une simple excoriation a été souillée par du sang ou des humeurs virulentes provenant d'animaux charbonneux ; un corps souillé de spores, échardes, instruments, etc., peut se charger d'insérer le virus dans les tissus. Le transport par les insectes et particulièrement les mouches est actuellement très discuté.

En d'autres atteintes, le charbon prend la *forme gastro-intestinale*, quand l'infection s'est effectuée par le tube digestif, à la faveur de l'ingestion de viande, de lait d'animaux charbonneux.

Enfin le *charbon pulmonaire* se déclare à la suite de l'inoculation par la voie pulmonaire, survenant après inhalation de poussières émanant de produits renfermant des spores charbonneuses (maladie des trieurs de laine, des chiffonniers).

Chez l'animal. — Le charbon spontané des animaux peut présenter les mêmes formes que chez l'homme. On connaît la forme cutanée, qui survient à la suite de la souillure spécifique d'une plaie superficielle siégeant au niveau des extrémités ; mais l'animal s'infecte habituellement par le tube digestif (*sang de rate* chez le mouton, *fièvre charbonneuse* des bovidés), en avalant par exemple du fourrage véhiculant des spores charbonneuses.

Pasteur, Roux et Chamberland ont d'ailleurs pu réaliser expérimentalement ce mode de contamination chez des bovidés à qui ils donnèrent à ingérer de la luzerne arrosée de cultures avec spores charbonneuses. L'infection est plus sûre si l'on mêle à ce repas des objets piquants (feuilles de chardon desséchées, épis d'orge), qui excorient la muqueuse buccale ou intestinale.

L'infection charbonneuse s'effectue donc, dans les conditions naturelles, le plus souvent par les aliments souillés de spores. Pasteur, Chamberland et Roux ont montré que ces spores provenaient des produits répandus par les animaux charbonneux et de leurs cadavres. Pasteur a d'ailleurs, par l'inoculation expérimentale de fragments de terre, démontré la présence de spores dans le sol entourant et recouvrant des animaux morts du charbon douze ans auparavant. Les spores sont ramenées à la surface par les travaux de labour, ou par les vers de terre.

On comprend comment, dans ces conditions, les pâturages de la Beauce, dits *champs maudits*, peuvent recéler la spore charbonneuse et la livrer au bétail, qui s'infecte au contact du sol souillé spécifiquement et en broutant l'herbe qui le recouvre.

Charbon expérimental.

De nombreux animaux sont sensibles à l'inoculation de la bactéridie charbonneuse :

Le *mouton* est très sensible à l'injection sous-cutanée et à l'ingestion ; toutefois, Chauveau a montré que le mouton algérien était réfractaire ; les *bovidés* sont plus sensibles à l'ingestion de produits virulents qu'à l'inoculation sous la peau ; le *cheval* et les *équidés*, au contraire, contractent rarement le charbon par la voie intestinale ; chez eux, l'infection cutanée est plus fréquente. Le *lapin*, le *cobaye*, la *souris* sont plus facilement infectables par la peau que par le tube digestif. Le rat blanc est habituellement réfractaire.

Les *carnassiers* sont en général peu réceptifs ; le *chien* adulte notamment présente de l'immunité naturelle ; cette dernière peut cependant être vaincue par l'inoculation intraveineuse ; Martel a montré que le chien enragé succombe en vingt-quatre heures à l'inoculation sous-cutanée, alors qu'avec une même dose le chien sain résiste. Les jeunes chiens sont assez réceptifs.

Dans les conditions naturelles, les *oiseaux* sont réfractaires ; si cependant on diminue préalablement leur résistance, ils peuvent contracter l'infection expérimentale. C'est ce qu'a démontré Pasteur en inoculant une poule et en lui maintenant les pattes dans de l'eau froide à 25° ; elle contracte ainsi le charbon. Le pigeon est plus sensible que la poule.

Inoculation sous-cutanée. — Il suffit d'inoculer sous la peau du cobaye ou du lapin quelques gouttes de sang charbonneux ou d'une culture de bactéridie charbonneuse, ou plus simplement encore une aiguille chargée de virus, pour voir se développer bientôt les symptômes et les lésions du charbon ; mais, chez l'animal, *on n'observe jamais la pustule maligne qui se développe chez l'homme.*

Dix à quinze heures après l'injection, au point d'inoculation, prend naissance un œdème assez marqué, qui s'étend plus ou moins : les ganglions les plus proches s'hypertrophient, la fièvre s'élève et monte de 1 à 2°.

Jusque vers la vingt-quatrième ou trente-sixième heure, les phénomènes généraux sont peu marqués ; l'animal conserve même les apparences de la santé, quand brusquement les bactéries envahissent la circulation et l'état général s'aggrave ; il devient dyspnéique, tombe dans le coma ; l'hypothermie apparaît et la mort survient après quelques convulsions.

L'*autopsie* montre les lésions suivantes :

Au point d'inoculation, on découvre un *œdème gélatineux* assez étendu, teinté en rose, dont les frottis montrent une foule de bactéridies charbonneuses ; les leucocytes y sont rares. Les ganglions voisins sont tuméfiés, rouges, entourés d'une zone œdémateuse.

Le *sang* est noir, poisseux et se coagule difficilement. Il fourmille de bactéridies. Des examens pratiqués pendant la vie permettent de se rendre compte que, dès les premières heures, la bactéridie passe de la lésion locale dans le sang et les veines par l'intermédiaire des lymphatiques, mais ne s'y multiplie pas; l'état septicémique proprement dit ne se produit que quelques heures avant la mort.

La *rate* est hypertrophiée, rouge foncé, diffluente et molle.

Les *reins* sont rouges, congestionnés, gorgés de sang.

Le *foie*, les *poumons* présentent des altérations analogues.

Fig. 183. — Coupe de rein montrant l'abondance des bactéries dans un glomérule.

Dans tous les viscères, les bactéridies pullulent; il est à remarquer cependant que les épithéliums restent intacts et ne sont pas envahis par la pullulation microbienne; celle-ci s'effectue au niveau des capillaires seuls. La lumière de ces derniers est littéralement bourrée de ces germes (fig. 183), qui provoquent de véritables embolies capillaires, amenant des ruptures vasculaires. Ces dernières contribuent à entraîner les microbes dans l'urine, le lait. C'est à leur faveur que le fœtus des femelles en gestation peut s'infecter, sinon le placenta forme un véritable filtre pour la bactéridie.

Inoculation par les voies digestives. — Quand on donne à ingérer au mouton, par exemple, des aliments vecteurs de spores

charbonneuses, on observe le tableau clinique et les lésions du « charbon interne » spontané; l'appétit disparaît tout d'abord, la rumination cesse. L'animal présente des coliques; la pression de l'abdomen est douloureuse. Puis la température s'élève; la respiration est dyspnéique, la démarche devient chancelante, l'urine est rougeâtre, les matières fécales sont molles et mélangées de sang. L'animal se couche, présente des tremblements; il rejette par les narines et la bouche de l'écume sanguinolente, et, après quelques convulsions, il succombe. L'infection évolue ainsi entre une et vingt-quatre heures suivant les cas.

A l'autopsie, les lésions portent surtout sur le tube digestif. La cavité péritonéale renferme un liquide séreux, rougeâtre; la séreuse est parsemée de suffusions hémorragiques. La paroi de l'estomac est œdématiée, la muqueuse congestionnée. Les parois de l'intestin grêle sont envahies par des foyers hémorragiques, isolés ou confluents, perceptibles aussi au niveau de la muqueuse.

Les vaisseaux épiploïques et mésentériques sont gorgés de sang noir et visqueux. Les *ganglions mésentériques* sont tuméfiés, hémorragiques, enveloppés d'une zone œdémateuse étendue; ils forment souvent comme une énorme tumeur.

Le *foie* est congestionné, friable, de teinte feuille morte.

La *rate* est tuméfiée; son parenchyme est transformé en pulpe boueuse lie de vin.

Le *rein* est congestionné et parsemé d'ecchymoses.

Les *poumons* présentent des foyers congestifs, hémorragiques même; les *ganglions thoraciques* et *médiastinaux* sont souvent intéressés.

Le *cœur* est mou et flasque. La *plèvre* et le *péricarde* contiennent un exsudat séreux, rougeâtre.

En d'autres cas, le point de départ de l'infection paraît se trouver au niveau de la muqueuse de la bouche et de l'arrière-gorge, ainsi que le prouve la présence des ganglions tuméfiés, sous-maxillaires et rétro-pharyngiens.

Inoculation par les voies respiratoires. — Faire inhaler à un animal des poussières chargées de bactéridies, ou bien inoculer une culture virulente dans la trachée d'un cobaye ou d'un lapin (Muskatbluth, Tchistovitch, Boidin); ces derniers contractent un charbon pulmonaire qui tue en trente-six à quarante-huit heures.

L'autopsie montre des foyers congestifs, disséminés dans les poumons. Au microscope, les alvéoles sont bourrés de bactéridies; leur paroi, épaissie et œdémateuse, est envahie par le germe spécifique.

Les lésions des autres viscères et du sang sont superposables à celles qui ont été décrites précédemment.

RÉPARTITION DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE DANS L'ORGANISME.

Dans la *pustule maligne* qu'on observe chez l'homme et qui résume souvent toute l'infection charbonneuse, la bactéridie reste habituellement cantonnée au niveau de cette lésion locale. Le bacille charbonneux s'y trouve dans l'épaisseur de l'escarre, principalement dans sa couche profonde ; mais il est plus particulièrement abondant au niveau de la barrière leucocytaire réactionnelle. De plus, à la périphérie, les bactéridies forment des couronnes assez denses autour des follicules pileux et des glandes sudoripares ; elles abondent dans l'infiltration œdémateuse. Elles siègent encore dans les ganglions les plus voisins. En ces cas, la bactéridie ne se généralise habituellement pas: Guillain, Boidin et N. Fiessinger ont pu cependant la déceler, dans un cas terminé par guérison, par l'hémoculture seule.

Quand l'infection se généralise, on constate alors, surtout à la période terminale, des bactéridies nombreuses dans le sang circulant. A l'autopsie, l'examen des viscères les révèle dans les frottis et les coupes d'organes, où elles siègent exclusivement dans les capillaires, sans atteindre les parenchymes.

Chez l'animal, dont l'infection est le plus souvent sévère et mortelle, on retrouve la bactéridie dans l'œdème au point d'inoculation, dans le sang et tous les viscères.

NATURE DE L'INFECTION CHARBONNEUSE.

Le fait que l'on observe à l'autopsie une généralisation de la bactéridie charbonneuse, envahissant la circulation sanguine et les viscères, prouve suffisamment que l'infection charbonneuse est, en réalité, une *septicémie*. Suivant le mode et les voies d'infection, cette septicémie peut être primitive, ou bien secondaire à une détermination locale, telle que l'est la pustule maligne.

Certains auteurs, Toussaint entre autres, ont pensé pouvoir expliquer les accidents causés par cette septicémie en invoquant les embolies capillaires constatées en maints cas; il est vrai qu'en d'autres la mort survient en leur absence et alors que la septicémie est relativement minime. Pour d'autres la gravité de l'infection proviendrait de l'état asphyxique du sang, causé par l'utilisation de l'oxygène par les bactéridies.

En réalité, la pullulation microbienne ne résume pas toute l'infection charbonneuse; il faut tenir compte aussi des produits toxiques mis en évidence par plusieurs auteurs. On a vu que la toxine préparée par Marmier tuait les animaux de laboratoire, cobayes, lapins, souris. D'autre part,

en inoculant sous la peau de divers animaux des bactéridies tuées ou des extraits éthérés ou chloroformés de bactéridie charbonneuse, Boidin a pu reproduire les lésions de l'œdème malin, comme le fait l'injection de bactéridies vivantes, à cette différence près que ces dernières, développant une chimiotaxie négative, ne provoquent pas l'appel leucocytaire accompagnant l'inoculation des premières substances. Les lésions observées dans le poumon à la suite de l'injection intratrachéale sont du même ordre.

D'autre part enfin, quand ils sont solubilisés, ces extraits provoquent dans l'état général des désordres tels qu'ils déterminent la mort de l'animal.

Par conséquent, les troubles locaux et généraux doivent être attribués d'une part à la bactéridie, de l'autre aux produits toxiques retenus dans le corps microbien et mis ensuite en liberté.

DIAGNOSTIC DE L'INFECTION CHARBONNEUSE.

Le diagnostic de l'infection charbonneuse sur le vivant et le cadavre comporte plusieurs épreuves.

Sur le vivant. — *Recherche de la bactéridie.* — *Chez l'homme*, la recherche de la bactéridie charbonneuse varie suivant la forme du charbon présentée par le malade.

Le plus souvent, le prélèvement doit être effectué au niveau de la *pustule maligne* ; à la surface de la pustule on pratique une scarification à l'aide d'une lancette stérile, et on aspire avec une pipette flambée la sérosité qui se met à sourdre.

En cas de *charbon pulmonaire*, on prélèvera les crachats.

S'il s'agit de *charbon intestinal*, les matières fécales seront examinées.

Enfin, dans tous les cas de charbon, quelle qu'en soit la forme, on prélèvera le sang, soit par piqûre au doigt ou au lobule de l'oreille, soit de préférence à une veine du bras, pour en effectuer l'hémoculture.

Chez l'animal, la technique du prélèvement est la même.

Examen microscopique direct. - Étaler sur lame les produits prélevés. Laisser sécher, fixer, colorer par la méthode de Gram. En cas de charbon, on perçoit en plus ou moins grande abondance la bactéridie charbonneuse avec ses caractères morphologiques connus. Dans les cas douteux, et dans ceux où les éléments microbiens sont peu nombreux, compléter cet examen par les cultures.

Cultures. — Effectuer des isolements pour obtenir des colonies séparées, car, dans le suc de la pustule, les crachats et surtout les matières fécales, des microbes étrangers peuvent se trouver associés. Noter les caractères des colonies suspectes et les ensemencer sur milieux appropriés, notamment le bouillon et la gélatine, où la culture prend un aspect caractéristique.

Inoculation. — On peut inoculer directement sous la peau du cobaye le matériel prélevé, ou bien les inoculations seront pratiquées à l'aide des cultures pures obtenues après isolement. En

cas de charbon, une minime quantité peut déterminer chez le cobaye une infection charbonneuse mortelle, qu'il sera facile de vérifier à l'autopsie.

Recherche des anticorps dans le sérum. — On a vu que la recherche de l'*agglutination* n'avait aucune valeur. Par contre, d'après Guillain, Boidin et N. Fiessinger, la recherche de la sensibilisatrice spécifique peut donner des résultats positifs, utiles pour le diagnostic.

Sur le cadavre. — Une technique identique s'impose pour la recherche de la bactéridie sur le cadavre, mais elle doit être complétée par l'examen des frottis des viscères (foie, poumons, rate, ganglions, épiploon), et la culture du suc de ces organes. Au besoin on devra recourir aux inoculations, voire même aux coupes d'organes, mettant, après coloration, les bactéridies en évidence.

Toutes ces épreuves sont simples quand le cadavre est frais ; mais, s'il est putréfié, on se heurte parfois à de grandes difficultés: les cadavres putréfiés en effet sont envahis par le Vibrion septique, qui présente certaines analogies morphologiques avec la bactéridie charbonneuse. L'inoculation du sang et des sucs d'organes à l'animal ne résout pas le problème, car, en ce cas, l'animal succombe par la septicémie vibrionienne, avant de présenter la septicémie charbonneuse. Il faut donc recourir à l'isolement par les cultures ; il est possible dans les milieux aérobies où la bactéridie pullule et où le Vibrion septique ne pousse pas.

Dans les cadavres datant d'un certain temps, le bactéridie peut avoir disparu du sang et des viscères. Or Ciuca et Stoïesco ont montré qu'en pareil cas elle est encore décelable dans la peau.

Néanmoins la *réaction des thermoprécipitines* (Ascoli) permet de résoudre les difficultés ; elle est basée sur cette constatation que les extraits d'organes atteints de charbon donnent un précipité quand on les met en contact avec du sérum anticharbonneux, même s'ils sont dans un état avancé de putréfaction.

Pour l'effectuer : les organes supposés atteints (foie, rate, ganglions, cœur) sont immergés dans une solution saline (4 à 5 centimètres cubes de solution pour 1 gramme de viscère).

Faire bouillir au bain-marie pendant cinq minutes, dans un ballon, le liquide de macération ; laisser refroidir; filtrer sur un papier double jusqu'à ce qu'il apparaisse clair ou à peine opalescent. En verser $0^{cc},25$ dans un tube à essai. Introduire dans un tube capillaire, la même quantité de sérum ; immerger ce tube capillaire dans le tube à essai contenant le filtrat, de façon que l'extrémité du capillaire touche le fond du tube avant que le sérum commence à

sortir. Le sérum s'écoule petit à petit et se dispose en une couche inférieure qui sera surmontée par le liquide filtré. Si le viscère contient de la bactéridie charbonneuse, un anneau blanchâtre se forme à la limite de séparation des deux liquides.

RECHERCHE DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE DANS LES MILIEUX EXTÉRIEURS

Employer la technique imaginée autrefois par Pasteur pour mettre la bactéridie charbonneuse en évidence dans la terre des « champs maudits » et l'isoler en culture pure :

Broyer dans un mortier une petite quantité de terre ; la mettre en suspension dans de l'eau stérile ; quand la terre s'est déposée, décanter et verser dans un verre à pied le liquide surnageant, qui contient encore des particules très fines. Celles-ci se déposent d'elles-mêmes. Décanter le liquide et aspirer le dépôt dans des pipettes stériles, que l'on scelle au chalumeau.

Pour éliminer les microbes non sporulés, chauffer ces pipettes au bain-marie à 85° pendant quinze à vingt minutes. Puis ensemencer en boîtes de Petri *aérobies* où l'on a préalablement coulé de la gélatine. Porter à l'étuve à 20° et examiner les colonies ; ensemencer celles qui paraissent suspectes, et les identifier par la culture et les inoculations.

La recherche dans la *vase* s'effectue d'une façon sensiblement analogue. Dans l'*eau*, elle est plus simple : elle ne comporte que l'ensemencement direct sur plaques de gélatine.

IMMUNITÉ. — VACCINATION.

Nous avons vu que certaines races ou espèces animales sont plus ou moins sensibles à l'infection charbonneuse ; certaines sont réfractaires.

Il est fort probable que, chez l'homme, une atteinte de charbon confère l'immunité. Enfin Pasteur avait remarqué que les bovidés ayant résisté à l'infection charbonneuse supportaient sans dommage des inoculations de produits virulents ; il avait conclu de cette observation que l'inoculation des cultures atténuées pourrait préserver l'animal des atteintes spontanées. De là la méthode des vaccinations pastoriennes.

Vaccination pastorienne. — La vaccination anticharbonneuse s'effectue à l'aide des cultures atténuées et dont la virulence minima a été fixée comme il a été indiqué plus haut (p. 396).

Toutefois, pour que l'immunité conférée soit solide, il faut que les phénomènes provoqués par l'inoculation de virus soient suffisamment intenses. Or, un virus trop actif, bien qu'atténué, peut provoquer l'infection charbonneuse. Aussi convient-il d'injecter tout d'abord un vaccin très faible, puis, une semaine après, un vaccin plus énergique, que l'animal supportera sans inconvénients.

Technique de la vaccination. — On commence par inoculer à l'animal, sous la peau, du *premier vaccin* (1/4 de centimètre cube pour la vache, 1/8 de centimètre cube pour le mouton). Ce premier vaccin est une culture charbonneuse dont la virulence est assez atténuée pour qu'elle soit inactive vis-à-vis du lapin et du cobaye et ne tue que la souris.

Douze jours après, on inocule le *deuxième vaccin*, dont la virulence est moins atténuée, et qui, épargnant le lapin, tue la souris et le cobaye.

Preuves de son efficacité. — Pasteur, Chamberland et Roux, en 1884, ont prouvé les premiers l'efficacité de la méthode. A Pouilly-le-Fort, 25 moutons furent vaccinés en deux séances à douze jours d'intervalle, suivant le procédé décrit ; quatorze jours après la deuxième vaccination, tous furent soumis, ainsi que 25 témoins, à l'inoculation d'un virus fort, non atténué. Deux jours après, les 25 témoins avaient succombé, les 25 vaccinés résistèrent.

Depuis cette époque, la méthode pastorienne est entrée dans la pratique courante.

L'immunité est habituellement conférée quatorze à quinze jours après la deuxième vaccination ; sa durée est variable suivant les individus. D'après Chamberland, au bout d'un an, 60 p. 100 des vaccinés sont encore immunisés. Aussi, en pratique, dans les régions d'endémie charbonneuse, la vaccination des troupeaux doit-elle être renouvelée chaque année.

Symptômes et accidents dus à la vaccination. — En règle générale, la vaccination n'est suivie d'aucun trouble local ou général. Parfois cependant, chez le mouton, la vache, le cheval, au point d'inoculation, un léger œdème se forme, suivi d'engorgement ganglionnaire. Ces phénomènes rétrocèdent en quelques jours sans laisser d'autre trace qu'un léger noyau induré.

Des accidents mortels peuvent cependant se produire dans 0,25 ou 0,50 p. 100 des cas. Ils s'observent chez les animaux jeunes ou déjà affaiblis par une affection étrangère ou une mauvaise alimentation. D'après Bigoteau, il se peut que ces accidents surviennent chez des sujets en état d'infection latente. Enfin un certain nombre de ces décès doivent être attribués à une contamination accidentelle, se produisant avant que l'animal n'ait acquis l'immunité.

Vaccination par la toxine charbonneuse. — Avant que Pasteur ait effectué ses premiers essais par les virus vivants atténués, Toussaint avait tenté de conférer l'immunité en injectant du sang charbonneux défibriné, chauffé pendant dix minutes à 55°; il injectait ainsi, en réalité, des bactéridies tuées. Ce procédé ne donnait de résultat positif que si le virus avait conservé une partie de son activité.

Plus tard, Hankin essaya, mais en vain, de vacciner les animaux avec la toxine obtenue par son procédé.

Marmier, par contre, a pu immuniser des animaux de laboratoire en leur inoculant à doses répétées sa toxine préparée dans un milieu de peptone glycérinée. Mais l'immunité obtenue ne dure pas plus de cinq à six semaines après la dernière inoculation.

Vaccination par sérum-virus. — Cette méthode, imaginée par Sobernheim, consiste à injecter simultanément à l'animal, sous la peau d'un des flancs, une culture atténuée, et sous la peau de l'autre flanc ou dans la veine 10 centimètres cubes de sérum anticharbonneux. Une telle vaccination unique conférerait une immunité plus solide et plus durable que les vaccinations pastoriennes. En Amérique du Sud, l'auteur a vacciné ainsi 200 000 bovidés; le déchet observé n'a atteint que 0,1 p. 1 000.

SÉROTHÉRAPIE.

Plusieurs auteurs ont préparé un sérum anticharbonneux en inoculant à l'animal des doses progressivement croissantes de cultures de bactéridie charbonneuse.

Préparation du sérum. — ***Sérum de Marchoux.*** — Marchoux a immunisé des lapins et des moutons. Les moutons sont tout d'abord inoculés avec le vaccin anticharbonneux, puis ils reçoivent chaque semaine par la voie cutanée des doses de cultures de plus en plus considérables, pouvant atteindre 200 et 300 centimètres cubes en une seule injection. La saignée destinée à recueillir le sérum est effectuée quinze à vingt jours après la dernière inoculation.

Ce sérum ne présente aucun pouvoir bactéricide ou antitoxique. Par contre, il est doué de propriétés préventives et curatives.

Injecté sous la peau d'un lapin de 2 kilogrammes, à la dose de 1 centimètre cube, vingt-quatre heures avant 0cc,25 de culture, dose sûrement mortelle, il empêche l'infection de se produire. Quand l'injection de cultures est faite dans le péritoine, la dose de sérum capable de protection doit être élevée à 15 centimètres cubes. Si l'injection est intraveineuse, 20 centimètres cubes de sérum ne font qu'assurer une survie de trois jours sur le témoin.

Quand les injections de sérum et de virus sont simultanées, Marchoux n'a observé que 7 guérisons sur 24 animaux en expérience. Les animaux qui succombent présentent néanmoins une survie légère sur les témoins.

Enfin, quand le sérum (6 centimètres cubes) intervient quatre heures après l'injection de virus, la survie peut être obtenue.

Sérum de Sclavo. — Par le même procédé, Sclavo a immunisé des moutons et des ânes.

Le sérum de mouton à la dose de 2 centimètres cubes préserve le lapin contre la dose mortelle de culture. Mêmes propriétés pour le sérum d'âne.

Sérum de San Felice. — San Felice vaccine des chiens fournissant un sérum agissant préventivement contre l'infection charbonneuse du lapin, mais inefficace chez le cobaye. Il est curatif pour le lapin ; injecté à la dose de 7 centimètres cubes par kilogramme d'animal, quarante heures après l'inoculation du virus, il arrête les progrès de l'infection.

Mode d'action. — On ignore encore comment agit le sérum anticharbonneux. Il est dénué de toute propriété bactéricide et antitoxique. Le pouvoir agglutinatif est minime ; seul le pouvoir sensibilisateur a pu être mis en évidence (Bordet, Eller, Boidin).

Applications thérapeutiques. — L'application de la sérothérapie curative a été faite chez les grands animaux et chez l'homme.

Chez les grands animaux, l'injection de 50, 100, 150 centimètres cubes sous la peau, répétée plusieurs jours de suite, semble amener la rétrocession de la lésion locale, et la température s'abaisse.

Chez l'homme, des doses de 30 à 40 centimètres cubes injectées journellement ont amené, dans un certain nombre d'atteintes, une amélioration notable. D'après le petit nombre d'observations que l'on possède, le sérum semble limiter la lésion locale et améliorer l'état général ; il est juste d'ajouter que la gravité de la pustule maligne humaine est peu accusée. Il paraît peu efficace dans les cas d'œdème malin.

En réalité, les atteintes traitées par le sérum sont en nombre trop insuffisant et de caractère trop disparate pour qu'on puisse juger de son efficacité réelle.

CHAPITRE XXVIII

BACILLE DIPHTÉRIQUE

En 1883, Klebs démontrait, dans les fausses membranes diphtériques, l'existence d'un bâtonnet spécial auquel il attribuait un caractère spécifique dans l'étiologie de la diphtérie. Un an plus tard,

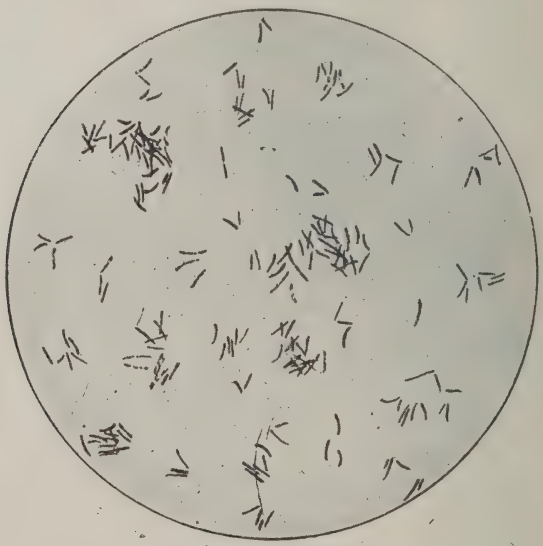

Fig. 184. — Bacille de Löffler long.

Löffler cultiva ce germe, l'isola sur des milieux spéciaux. Ce microbe devint plus tard l'objet de recherches nombreuses, parmi lesquelles il faut citer celles de Roux et Yersin, qui, après avoir confirmé les faits avancés par leurs prédécesseurs, démontrèrent définitivement la spécificité du Bacille de Klebs-Löffler, en reproduisant expérimentalement la diphtérie à l'aide des cultures de ce microbe, en provo-

uant chez les animaux des paralysies analogues à celle qu'on observe en clinique humaine; ils étudièrent sa toxine; tous ces beaux travaux furent le point de départ de la sérothérapie antidiphtérique (Roux et L. Martin), qui, à l'heure actuelle, a sauvé tant de vies humaines.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — Le Bacille diphtérique est un bâtonnet immobile, dont les dimensions sont assez variables suivant les échantillons isolés.

Dans les fausses membranes dont ils occupent la zone superficielle,

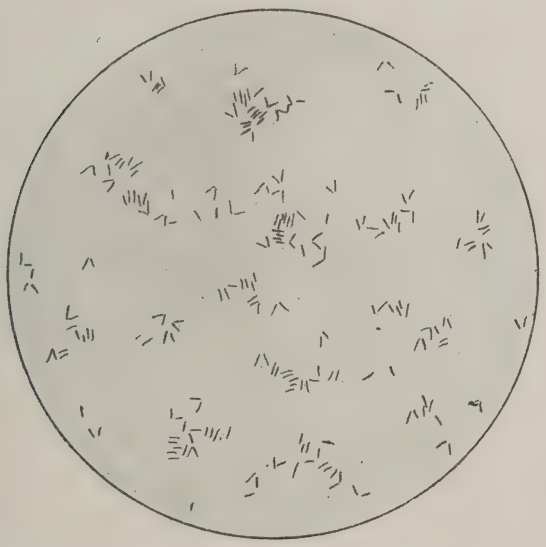

Fig. 185. — Bacille de Löffler moyen.

on les trouve souvent groupés en amas, où ils semblent former une culture sur place : ils figurent assez fréquemment de véritables buissons. Ils prennent la forme de bâtonnets droits ou incurvés, à extrémités arrondies, dont l'une est parfois renflée en massue, lui donnant ainsi l'aspect d'un *cornichon* ou d'une *haltère*.

Dans les cultures jeunes, ils se montrent sous un aspect à peu près identique, plus régulier cependant, mais présentant, plus que dans les fausses membranes, des dimensions différentes.

Le plus souvent leur forme est *longue* (*variété longue*) : ils mesurent

4 à 5 μ. Ils sont habituellement groupés en *amas broussailleux* plus ou moins abondants, ou en *paquets d'épingles* (fig. 184).

En d'autres cas, ils mesurent 3 à 4 μ (*variété moyenne*) : ils sont alors groupés en palissades, mais celles ci sont généralement peu régulières et semblent disloquées : ou bien ils sont disposés deux à deux, bout à bout, ou encore disposés obliquement pour former un V ou un accent circonflexe (fig. 185).

Dans la *variété courte*, ils mesurent 2 μ de long sur 0 μ,8 de large

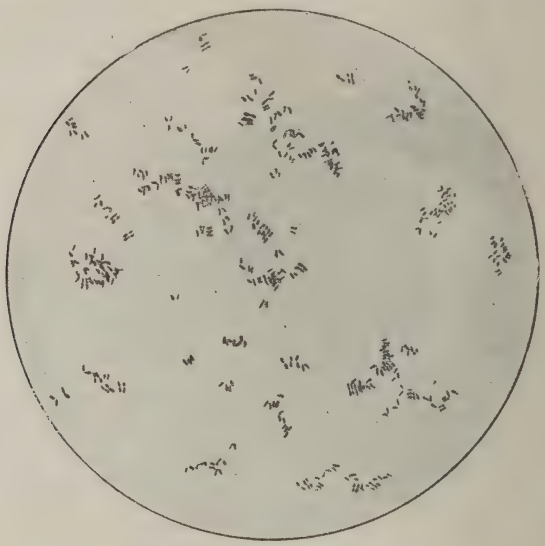

Fig. 186. — Bacille de Löffler court.

et présentent une forme coccobacillaire (fig. 186). Là encore, ils sont souvent associés deux par deux et disposés en palissades.

Dans les vieilles cultures on observe fréquemment des formes d'involution (fig. 187) : Bacilles piriformes, en massues, en haltères, parfois ramifiés. Ces aspects peuvent se rencontrer aussi dans certaines fausses membranes.

Coloration. — Le Bacille de Löffler se colore aisément par les couleurs basiques d'aniline : il prend bien la fuchsine de Ziehl, le bleu de Roux, le bleu de Löffler, le violet de gentiane. *Il prend le Gram*, mais, si l'action de l'alcool absolu est trop prolongée, il finit par se décolorer. C'est un détail de technique qu'il convient de ne pas oublier.

Après coloration, surtout si cette dernière est faible, on remarque souvent que le corps du Bacille n'est pas toujours homogène ; un certain nombre d'échantillons contiennent des *granulations*, d'autant plus abondantes que le Bacille est plus long. Ces granulations peuvent aussi se montrer sous la forme de raies transversales, si bien que Wesbrock, Wilson et Mac Daniel distinguent : des Bacilles granuleux et des Bacilles barrés qui paraissent segmentés. Les Bacilles courts restent le plus souvent homogènes.

Fig. 187. — Formes d'involution dans une culture âgée.

Enfin certains procédés de coloration permettent de mettre en évidence, aux extrémités de ce germe, des granulations signalées en 1885 par Babès ; ce sont les *corpuscules métachromatiques* (fig. 188), appelés encore *corpuscules polaires* en raison du siège qu'ils occupent. Diverses méthodes peuvent les faire déceler :

Procédé de Neisser. — On émulsionne dans une goutte d'eau versée sur une lame une parcelle d'une colonie âgée de vingt-quatre heures, provenant d'une culture sur sérum. On fait agir pendant quelques secondes une solution de 1 gramme de bleu de méthylène dans 20 centimètres cubes d'alcool à 90°, le tout additionné de 950 centimètres cubes d'eau distillée et de 50 centimètres cubes d'acide acétique glacial. Laver à l'eau, puis colorer pendant trois à cinq secondes dans une solution de 2 grammes

de vésuvine dans 1 litre d'eau distillée bouillante. Laver de nouveau à l'eau.

Ainsi traitée, la préparation montre des Bacilles de Löffler teintés en brun, portant aux extrémités des grains colorés en bleu noir.

Dans un procédé nouveau, Neisser colore avec le mélange suivant :

Solution A (2 parties).	Poudre de bleu de méthylène	1
	Alcool	2
	Eau distillée	1 000
	Acide acétique glacial	50
Solution B.	Kristall-violet de Höchst	1
	Alcool	11
	Eau distillée	300

On colore pendant une seconde, on lave, et on fait agir pendant trois secondes une solution de chrysoïdine à 1 p. 100 préparée à chaud et filtrée.

Les corps bacillaires présentent une teinte jaune verdâtre ; les granulations polaires sont colorées en violet foncé.

Procédé de Falière. — Falière colore avec le mélange suivant :

Bleu de méthylène	1
Borax	0,5
Eau distillée	100
Alcool absolu	VIII gouttes.

Laver à l'eau, et colorer le fond avec une solution de vésuvine à 1 p. 1 000.

Procédé de Tribondeau et Dubreuil. — Émulsionner sur une lame porte-objet une parcelle de colonie de B. diphtérique dans une gouttelette d'eau distillée ; étaler, laisser sécher ; fixer à l'alcool absolu.

Colorer pendant environ cinq minutes au kristall-violet phéniqué. Laver à l'eau ordinaire. Faire agir une solution de vésuvine à 1 p. 500 jusqu'à ce que la coloration du frottis passe du violet au brun (une à deux minutes, suivant l'épaisseur du frottis). Laver. Sécher.

Le corps des bacilles est teinté en jaune, et les granulations polaires en violet noir.

On a voulu attribuer à ces granulations polaires un caractère différentiel important, capable de séparer le Bacille de Löffler des bactéries diphtérimorphes où leur absence serait la règle. L'expérience montre que, présentes le plus souvent, mais pas toujours, dans le Bacille diphtérique, elles peuvent se rencontrer dans les bactéries similaires.

CULTURES.

Le Bacille diphtérique est un anaérobie facultatif; mais il pousse mieux en aérobiose.

Il commence à pousser à partir de 20°, mais jusqu'à 30° la culture est lente et maigre. La température optima est de 35 à 37°.

Bouillon ordinaire. — En bouillon de bœuf, et mieux en bouillon

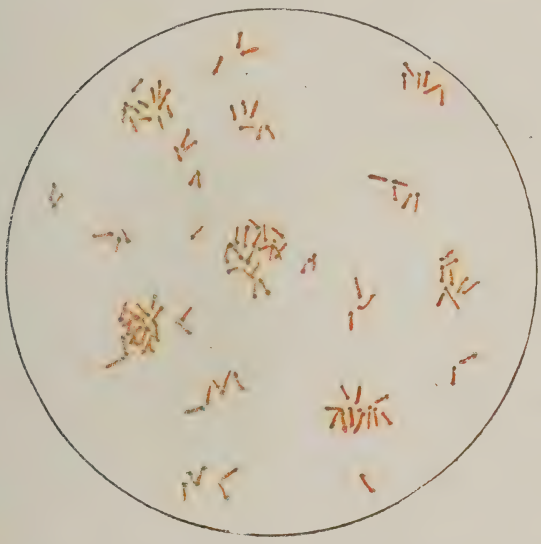

Fig. 188. — Corpuscules métachromatiques de Neisser.

de veau peptoné, le Bacille de Löffler trouble assez rapidement le milieu. En même temps de petits grumeaux blancs apparaissent sur les parois du vase, et à la surface se développe un voile mince, fragile, blanchâtre. Au fond du tube se dépose une masse blanchâtre, visqueuse; le liquide s'éclaircit au fur et à mesure.

Pendant les premiers jours, après l'alcalinité initiale, le milieu devient acide, pour redevenir alcalin si, en employant un matras de Fernbach, on installe en permanence un courant d'air pendant le séjour à l'étuve.

En bouillon additionné de glycérine ou de sucre, l'acidité apparaît plus rapidement et persiste longtemps; elle nuit au développement de la culture et à sa vitalité.

Bouillon Martin. — Mêmes caractères, mais développement plus abondant. De plus l'acidité ne se produit pas; enfin la vitalité et la virulence du Bacille persistent plus longtemps.

Gélatine. — Cultures minimes. Le long de la piqûre, des colonies blanchâtres, punctiformes, sont perceptibles. Pas de liquéfaction.

Gélose ordinaire. — Colonies se présentant sous forme de taches blanches, un peu plus épaisses au centre qu'à la périphérie ; elles se développent en trente à quarante-huit heures.

D'après Michel, la culture est plus abondante en *gélose glycérinée* ; de même aussi en *gélose à la pomme de terre.*

Sérum coagulé (milieu de choix). — Après seize à dix-huit heures de séjour à l'étuve à 37°, les colonies apparaissent sous la forme de petites taches rondes, blanc grisâtre, grosses comme une tête d'épingle, dont le centre est plus sombre que la périphérie. Vue à un faible grossissement, la colonie est finement granuleuse, sèche à la surface, régulièrement arrondie ; ses bords sont nets et légèrement translucides. Dans la suite, elles conservent le même aspect, mais atteignent 4 à 5 millimètres de diamètre au bout de cinq à huit jours.

En strie, les colonies deviennent rapidement confluentes et figurent une glaire grisâtre dont les bords sont irrégulièrement découpés.

Sur *sérum peptoné de Löffler* (3 parties de sérum de veau, 1 partie de macération de viande de veau peptonée et sucrée à 1 p. 100, salée à 0,5 p. 100), la culture est plus abondante.

Albumine d'œuf coagulée. — Si l'on n'a pas de sérum à sa disposition, l'albumine d'œuf coagulée par la chaleur peut rendre des services. Après vingt à vingt-quatre heures d'étuve, les colonies développées sont rondes, un peu saillantes, moins blanches que le milieu sur lequel elles reposent ; au bout d'une semaine, elles prennent une coloration brunâtre ou jaune rougeâtre.

Pomme de terre. — Sur pomme de terre alcaline, culture peu apparente. Sur pomme de terre acide, le développement est nul.

Lait. — Culture assez abondante, sans aucune coagulation.

Gélose profonde glucosée de Veillon. — L. Martin et Loiseau ont étudié les caractères particuliers de culture sur ce milieu anaérobie.

En piqûre. — Le long de cette dernière et dans la profondeur de la strie, les colonies se développent, mais sans s'étaler à la surface du milieu.

En masse. — Quand, après liquéfaction de ce dernier, on ensemence le bacille diphtérique dans toute l'étendue du milieu, ce

bacille pousse sous la forme d'un semis de petites colonies qui se répartissent uniformément dans toute l'épaisseur de la gélose, dans la profondeur comme à la surface ; les colonies superficielles ne s'étalent pas à l'air libre, même si on abandonne pendant plusieurs jours les tubes à la température du laboratoire.

Ces caractères sont différents de ceux qu'on observe avec les bactéries diphtériformes et notamment avec le Bacille de Hoffmann qui pousse exclusivement en aérobiose, et dont la culture se montre uniquement à la surface (V. p. 432).

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — D'une façon générale, le Bacille diphtérique présente une grande résistance vitale.

Dans les cultures, il est déjà très vivace, puisqu'une vieille culture en sérum datant de plusieurs mois peut donner encore un ensemencement positif.

Il résiste peu cependant à la chaleur quand il provient d'une culture en bouillon : quelques minutes à 55° suffisent à le détruire. Mais, quand la culture a été desséchée, il supporte volontiers la température de 95° pendant plusieurs minutes.

La lumière diffuse, d'après Ledoux-Lebard, se montre presque inactive : il n'en est pas de même de la lumière solaire, qui a raison de sa vitalité en quelques heures.

Très sensible aux antiseptiques (acide phénique à 1 p. 100), qui tuent les cultures en quelques secondes, quand elles sont humides, le Bacille de Löffler est beaucoup plus résistant si la même culture a été préalablement desséchée : ainsi Chantemesse et Widal, en expérimentant sur des fils de soie trempés dans les cultures, puis desséchés à l'étuve, et plongés dans les divers antiseptiques, ont vu qu'il résistait au moins trois minutes à l'action des produits suivants : acide phénique à 1 p. 100, sulfate de cuivre et sulfate de zinc à 0,5 p. 100; biiodure de mercure à 0,5 p. 100, eau salolée, acide salicylique en solution alcoolique à 5 p. 100, etc.

Dans les fausses membranes, surtout soumises à la dessiccation, la résistance est encore beaucoup plus considérable :

D'après Roux et Yersin, des fausses membranes desséchées, mises à l'obscurité, peuvent donner des cultures positives après plusieurs mois. D'ailleurs Park, Wright ont constaté sa longue vitalité sur les vêtements d'infirmiers, Abel sur des jouets d'enfants ayant eu la diphtérie. Les poussières des locaux infectés peuvent le conserver à l'état vivant pendant plusieurs mois.

Toutefois, si la fausse membrane a été exposée à la lumière, la vitalité est moins considérable : Roux et Yersin ont montré que, dans ces conditions, le Bacille ne résistait que quatre à six semaines.

Virulence. — La virulence du Bacille de Löffler est extrêmement variable. Dans une culture provenant d'un cas de diphtérie, certaines colonies sont très virulentes, d'autres beaucoup moins. C'est en général dans les atteintes graves qu'on trouve le plus de colonies virulentes ; inversement, dans les cas bénins, ces dernières sont rares.

L. Martin a montré que les formes longues du Bacille de Löffler étaient habituellement les plus virulentes, et que les formes courtes étaient les moins actives, Toutefois cette règle comporte des exceptions : tel Bacille long peut en effet être avirulent, alors que des Bacilles courts peuvent avoir une virulence très accusée (L. Martin).

Cette propriété du Bacille de Löffler est sujette à des variations, suivant les influences qu'on lui fait subir.

En général, elle s'atténue au fur et à mesure que les cultures vieillissent, surtout quand ces dernières subissent l'action d'un courant d'air. La dessiccation à l'air, la lumière agissent dans le même sens. Ainsi, dans une fausse membrane desséchée, les bacilles gardent longtemps leur vitalité, mais ils deviennent de moins en moins virulents.

On peut cependant faire récupérer la virulence à un bacille « atténué » : Roux et Yersin y ont réussi en cultivant en présence d'un Streptocoque un Bacille de Löffler ne provoquant chez le cobaye qu'un léger œdème au point d'inoculation. Injecté après cette symbiose, il tuait l'animal avec tous les symptômes de la diphtérie expérimentale.

Il est vrai que Roux et Yersin n'ont pu reproduire ces faits avec des bacilles devenus ou étant naturellement avirulents. Pour que l'expérience puisse réussir, il faut que le germe donne au moins, en injection sous-cutanée, de l'œdème au point d'inoculation.

L'exaltation de la virulence peut encore réussir en inoculant des bacilles peu actifs, mélangés à une petite quantité de toxine diphtérique (Trump). Bardoch l'a obtenue chez le chien après vingt-cinq passages dans l'organisme de cet animal, L. Martin chez le lapin, après des passages en série en sacs de collodion.

Réactions biochimiques. — *Formation d'acides.* — En bouillon, on l'a vu plus haut, le Bacille de Löffler engendre des produits acides. On suppose que l'acidité est due à la formation d'acide lactique, né aux dépens des hydrates de carbone contenus dans le

milieu. Elle dure tant que l'air ne se renouvelle pas. Si l'air se renouvelle, elle est remplacée par une réaction alcaline, liée à la production d'ammoniaque, se combinant à des produits entrant dans la constitution du milieu, et formant du phosphate ammoniaco-magnésien.

Certains auteurs, dans un but de différenciation du Bacille diphtérique et des germes diphtérimorphes, ont dosé cette acidité à l'aide de la solution normale de soude et de la phénolphtaléine. En ensemençant 5^{cc}, 3 de bouillon, le Bacille de Löffler développerait en vingt-quatre heures, d'après Lehmann, une acidité correspondant à $0^{cc},7$ d'une solution normale de soude à 1 p. 40; en quarante-huit heures, elle s'élèverait à $1^{cc},5$, ou $2^{cc},5$. Martin a montré que la production d'acide ou d'alcali est fonction de la composition du milieu.

Action fermentative sur les sucres. — D'après Graham-Smith, le Bacille diphtérique fait fermenter les sucres suivants : glucose, galactose, lévulose, souvent la maltose, la dextrine, la glycérine, parfois la saccharose, mais jamais la mannite.

Les résultats de Knapp, Zinsser ne sont pas conformes à ceux de Graham Smith en ce qui concerne la mannite et la saccharose.

Milieu de Thiel. — Pour Thiel, la seule fermentation constante serait celle de la glucose avec le milieu suivant :

Peptone Nutrose Glucose	aa	1 gramme.
Sel de cuisine		$0^{gr},05$
Tournesol de Kahlbaum		5 grammes.
Eau	100	—

On ensemence ce milieu avec du Bacille diphtérique légèrement alcalin ; si la fermentation se produit, le tournesol rougit, la nutrose précipite, parfois le milieu coagule ultérieurement.

Milieu de Rothe. — Rothe a imaginé un procédé qui permet de mettre en évidence, d'une façon constante, la fermentation de la *glucose* et de la *lévulose*.

On prépare du bouillon-sérum (4 parties de sérum de bœuf et 1 partie de bouillon neutre). On mélange 90 parties avec 10 parties d'une solution de tournesol de Kahlbaum contenant 1 p. 10 de sucre à éprouver, et préalablement stérilisée. Ce milieu, réparti en tubes ou en boîtes de Petri, est coagulé par la chaleur, comme le sérum de bœuf simple.

Avec ce milieu, le Bacille diphtérique fait virer au rouge les tubes ou boîtes ensemencés, contenant glucose et lévulose. La réaction est *constante* et *persistante*.

Pour Costa, J. Troisier et Dauvergne, le Bacille diphtérique ensemencé sur le milieu solide qu'ils ont imaginé (V. p. 441), *fermente* : *glucose*, *lévulose*, *maltose*, *galactose*; il reste *sans action* sur : *saccharose* (1), *lactose*, *mannite*, *dulcite*.

Tous les auteurs en tout cas sont d'accord pour admettre que, quel que soit le milieu utilisé, le Bacille de Löffler possède une action fermentative constante sur la *glucose* : réaction importante à retenir en vue de la différenciation d'avec les diphtérimorphes qui ne font pas fermenter ce sucre. De plus, la *gélose glucosée de Veillon additionnée de tournesol* rougit sous l'influence de la culture du Bacille diphtérique ; il reste intact si ce dernier est remplacé par le faux diphtérique d'Hoffmann (L. Martin et Loiseau).

Réactions vis-à-vis du sérum antidiphtérique. — ***Agglutination.*** — Nicolas, en 1897, a montré que le Bacille de Löffler pouvait être agglutiné par le sérum antidiphtérique. Il se servait, dans ce but, non de cultures en bouillon où les microbes s'agglutinent spontanément, mais de cultures rendues homogènes.

D'après L. Martin, Prévot et Loiseau, l'agglutination peut s'observer avec le sérum d'un cheval vacciné à l'aide d'une toxine provenant de cultures ayant longtemps séjourné à l'étuve, et où ont macéré des corps microbiens. Elle ne se produit pas quand la vaccination a été faite avec une culture très jeune.

L'agglutination est très nette avec le sérum des animaux immunisés avec les cultures microbiennes. Elle s'effectue par le procédé macroscopique.

On recueille avec une spatule la culture qui a poussé en boîtes triangulaires sur gélose à la pomme de terre (soit 50 centigrammes par boîte). Dans un mortier on opère un broyage et on l'émulsionne dans l'eau physiologique, de façon que l'émulsion contienne 2 milligrammes de corps microbiens par centimètre cube. Cette émulsion est stable et ne montre aucun dépôt après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve.

On verse dans chaque tube 1 centimètre cube de l'émulsion, puis 1 centimètre cube d'une série de dilutions de sérum. On met à l'étuve à 37°, et on observe après seize à dix-huit heures.

D'après certains auteurs, le Bacille de Löffler seul subirait l'agglutination : les Bacilles diphtérimorphes ne seraient pas agglutinables par le sérum spécifique. Lesieur a montré cependant que certains de ces derniers se comportent comme le Bacille diphtérique.

Enfin le Bacille de Löffler n'est pas agglutinable par le sérum des malades.

(1). D'après L. Martin, la fermentation de la saccharose peut être obtenue sur les milieux liquides.

Sensibilisatrice spécifique. — Mis au contact avec le sérum préparé par des injections de toxine, le Bacille de Löffler ne fixe pas le complément ; ce sérum ne contient donc pas de sensibilisatrice spécifique pour les microbes.

Avec du sérum antimicrobien, au contraire, Lambotte a vu la fixation du complément s'opérer.

Les recherches restent négatives avec le sérum des malades.

Avec les Bacilles diphtérimorphes, la réaction n'est pas constante ; les résultats de l'épreuve restent donc incertains.

Action hémolytique. — L'hémolyse des globules rouges mis en contact avec des cultures de Bacilles diphtériques a été observée par Lubenau en 1901. Schwoner la constate seulement sur les cultures provenant de diphtéries graves.

Costa, Troisier et Dauvergne ont repris ces recherches. Les milieux solides (sang défibriné mélangé à de la gélose glycérinée), déjà utilisés par Mandelbaum et Heinemann, Neisser et Gins ne leur donnèrent que des résultats variables ou douteux. A l'aide des milieux liquides au contraire (bouillon préparé avec de l'extrait de Liebig), ils obtinrent des résultats constants.

A une culture de vingt-quatre à quarante-huit heures, il suffit d'ajouter une à deux gouttes de sang humain citraté. Quelques heures après, un nuage d'hémoglobine s'élève au-dessus du culot hémolytique ; bientôt le tube entier prend une teinte rouge ; celle-ci s'obtient, suivant les cas, entre trois et quarante-huit heures d'étuve ; quelques échantillons ne sont hémolytiques qu'après trois à quatre jours.

Cette diphtérolysine paraît, *in vitro*, adhérente aux corps microbiens ; elle est thermolabile : Le chauffage à 56° pendant trente minutes atténue son action qui est complètement annihilée à 60°. Elle ne paraît pas être en rapport ni avec la toxicité, ni avec la virulence des échantillons de bacilles.

HABITAT. — PERSISTANCE. — ASSOCIATIONS SECONDAIRES.

Son siège dans l'organisme. — Le Bacille de Löffler siège dans les fausses membranes diphtériques, qui prennent naissance au niveau des muqueuses ou même de la peau. Il y pullule seul, ou en symbiose avec des germes associés (fig. 189). Là, il élabore un poison, une toxine, qui diffuse dans l'organisme et produit les accidents toxiques connus de la diphtérie.

Il peut cependant se rencontrer en dehors des fausses membranes : on le décèle dans certaines angines d'apparence banale, non recouvertes de l'exsudat diphtérique ; de plus, au cours d'une

diphtérie nasale, il peut siéger sur la muqueuse pharyngée ; au cours de la diphtérie de la gorge et du larynx, dans le mucus bronchique, sans donner lieu à des formations pseudo-membraneuses ; de même on l'a décrit dans des foyers de bronchopneumonie, associé à des germes vulgaires, le streptocoque notamment.

Plusieurs auteurs l'ont vu se généraliser et envahir la circulation, voire même certains viscères. Barbier et Ulmann, etc., l'ont

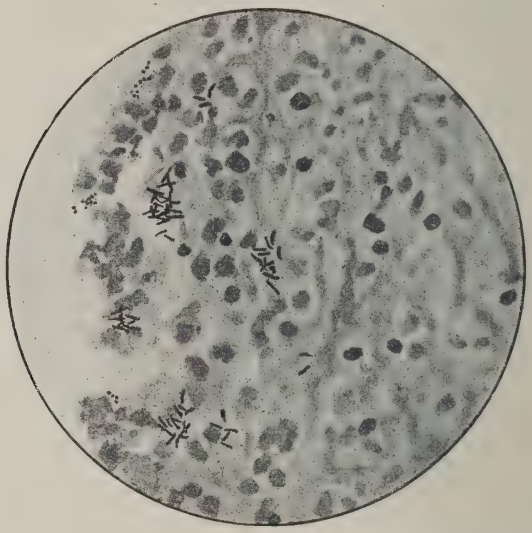

Fig. 189. — Coupe de fausse membrane diphtérique. Buissons de Bacilles de Löffler et à la surface cocci associés.

observé dans les coupes de bulbe, mais ne serait-ce pas à la faveur d'une pullulation microbienne *post mortem* ?

Sa persistance. — Dans la diphtérie, le Bacille de Löffler persiste tant que dure la lésion ; le plus souvent même, il lui survit ; les *convalescents* peuvent ainsi conserver le Bacille spécifique dans la gorge ou les fosses nasales pendant un temps assez long. Si parfois il disparaît en huit à dix jours, en d'autres cas il persiste plusieurs mois.

Porteurs de germes. — Bien plus, Roux et Yersin ont montré que des *sujets sains* peuvent l'héberger sans ressentir, du fait de sa présence, le moindre trouble. Ces *porteurs de germes* se rencontrent dans la proportion de 1, 5, 10 p. 100 ; leur proportion est

assurément plus élevée dans l'entourage des malades diphtériques. C'est une notion des plus importantes à retenir au point de vue épidémiologique et prophylactique, car ces sujets peuvent servir à la propagation de l'infection.

Associations secondaires. — Le Bacille de Löffler est rarement à l'état de pureté dans les fausses membranes. A la surface de celles-ci on décèle toujours quelques microbes, des cocci pour la plupart, provenant de la flore microbienne ambiante. Le plus souvent, ils restent inoffensifs et ne compliquent pas le processus diphtérique. En certains cas cependant, ils pullulent abondamment, et leur action pathogène vient s'ajouter à celle du Bacille de Löffler, dont ils renforcent même la virulence. Il s'agit alors d'une véritable *association microbienne*.

Parmi les microbes associés, le *Streptocoque* est le plus redoutable ; il contribue à déterminer chez certains sujets le tableau connu de la *strepto-diphtérie*, dont le pronostic est habituellement jugé comme très grave.

Signalons encore l'association secondaire avec le *Staphylocoque* doré, parfois grave, avec le *Pneumocoque*, rare mais sérieuse, le *coccus Brisou*, petit coccus décrit par Roux et Martin dans des cas bénins, le *Pneumobacille*, le *Colibacille*, etc., voire même des *anaérobies* (Kossel), expliquant certaines complications gangréneuses.

Le Bacille diphtérique chez les animaux. — Dans certains milieux ruraux, on a signalé des atteintes diphtériques chez des animaux de basse-cour. D'après les derniers travaux, la *dipthérie aviaire* ne serait pas une ; plusieurs germes seraient capables de la provoquer. Néanmoins en plusieurs circonstances, il semble bien que le Bacille de Löffler ait été en cause chez des volailles qui se seraient contaminées dans des fermes au contact d'enfants diphtériques. Le germe spécifique a été ainsi décrit dans les fausses membranes qu'elles présentaient.

Klein, d'autre part, a observé chez les bovidés des lésions diphtériques des trayons de vaches laitières, propagées sans doute par des sujets diphtériques, mais pouvant aussi transmettre la contagion à l'homme par le lait, ou le contact direct.

ACTION PATHOGÊNE EXPÉRIMENTALE.

On peut provoquer la toxi-infection diphtérique expérimentale par injection de cultures de Bacille de Löffler, à plusieurs sortes d'animaux : les plus sensibles sont le cobaye, le lapin, le chien, le pigeon. Le rat et la souris sont réfractaires.

Le cobaye est assurément l'animal de choix.

Cobaye. — *Inoculation sous-cutanée.* — Injection sous la peau du cobaye de 0cc,5 à 1 centimètre cube de culture de Bacille diphtérique âgée de vingt-quatre heures. Au point d'inoculation se produit rapidement de l'œdème où les Bacilles pullulent ; en même temps, la température s'élève, le poil se hérisse ; on observe de la dyspnée, et l'animal succombe en vingt-quatre à soixante-douze heures, suivant la dose employée et la virulence du germe.

A l'autopsie, on constate tout d'abord l'œdème sous-cutané, mais ne contenant plus qu'un petit nombre de germes. Les viscères sont congestionnés ; le poumon est parfois splénisé ; retenons l'hyperémie particulièrement intense dont les capsules surrénales sont le siège ; les ganglions sont hypertrophiés ; enfin les plèvres sont envahies par un épanchement séreux ou séro-sanguinolent abondant, ne contenant pas de Bacilles. Ces derniers n'envahissent ni le sang ni les viscères.

Inoculation intrapéritonéale. — L'inoculation dans le péritoine est moins sévère que sous la peau ; elle n'amène la mort qu'en quatre à dix ou même douze jours. A l'autopsie, on note l'existence d'un épanchement péritonéal contenant des Bacilles spécifiques ; les lésions viscérales sont les mêmes qu'après l'injection sous-cutanée. Le Bacille ne se généralise pas.

Inoculation au niveau des muqueuses. — L'attouchement simple d'une muqueuse saine à l'aide d'une culture de Bacilles de Löffler n'est suivi d'aucun effet. Pour réaliser la diphtérie expérimentale, l'attouchement doit être précédé d'un traumatisme ; dans ce but, il suffit d'excorier légèrement la muqueuse, ou de provoquer une brûlure superficielle à l'aide d'un agitateur chauffé à la flamme. Si l'on dépose immédiatement après une parcelle de culture sur la petite plaie, on assiste à la production de fausses membranes analogues à celles de la diphtérie humaine.

Il est facile de les reproduire sur toutes les muqueuses : muqueuse buccale, conjonctivale, vulvaire, etc.

L'inoculation sur la *muqueuse trachéale* est particulièrement intéressante : On trachéotomise un cobaye, on excorie la surface de la muqueuse, et on dépose sur cette dernière de la culture ; des fausses membranes se développent, réalisant un véritable croup expérimental avec ses accès de suffocation, de la dyspnée, de l'asphyxie, aboutissant en trois à quatre jours à la mort.

Lapin. — Cet animal est plus résistant que le cobaye ; il faut des doses assez élevées pour entraîner la mort ; sinon, au point d'inoculation, se forme une escarre qui finit par s'éliminer.

Injection sous-cutanée. — L'injection sous-cutanée de 2 à 4 centimètres cubes détermine la mort en quatre à cinq jours. Au point d'inoculation l'œdème est très marqué ; les ganglions régionaux sont congestionnés ; il en est de même de l'épiploon et du mésentère ; le foie est jaunâtre, mou, flasque, atteint de dégénérescence graisseuse ; les poumons sont rarement hyperémiés ; l'épanchement pleural est exceptionnel.

Inoculation à la surface de la peau de l'oreille. — Après application d'un vésicatoire, cette inoculation donne des fausses membranes cutanées caractéristiques ; pour éviter la dessiccation, on enferme l'oreille dans un petit sac imperméable.

Injection dans le péritoine. — Elle donne des lésions viscérales semblables à celles que provoque l'injection sous la peau.

Injection intraveineuse. — L'injection intraveineuse de 1 à 2 centimètres cubes le tue en moins de soixante heures, sans qu'on puisse déceler de bacilles dans la circulation. En plus des lésions précédentes, signalons l'existence d'un néphrite aiguë.

Inoculation sur les muqueuses, — Elle donne les mêmes résultats que chez le cobaye.

Chien. — L'inoculation sous-cutanée tue le chien en quatre à cinq jours (Roux et Yersin) : elle provoque de l'œdème au point inoculé, de l'ictère et une paralysie progressive.

Roux et Yersin ont observé les mêmes troubles à la suite de l'injection intratrachéale, mais la muqueuse de la trachée était indemne de fausses membranes.

Oiseaux. — L'injection sous-cutanée ou intramusculaire de 1 centimètre cube de culture en bouillon chez la poule ou le pigeon amène la mort en moins de soixante heures. Au point d'inoculation siège un enduit grisâtre accompagné d'œdème. Les viscères sont congestionnés. Avec un cinquième de centimètre cube, ils résistent souvent, mais présentent parfois des paralysies.

Plus sensibles encore sont les petits oiseaux : les moineaux, calfats, etc. Des bacilles peu virulents pour le cobaye les font succomber rapidement par injection sous-cutanée (Simonin et Benoit).

TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Le Bacille de Löffler ne se rencontrant qu'au niveau des fausses membranes, on a pensé que les phénomènes généraux devaient relever d'un poison élaboré par le germe cantonné dans la lésion locale. L'existence de ce poison peut, en effet, être mise en évidence dans les cultures (Roux et Yersin).

Mode de préparation. — L'obtention d'une toxine active est sujette aux conditions essentielles suivantes :

1° *Conditions relevant du bacille.* — Tous les Bacilles diphtériques ne sont pas aptes à fournir une toxine active. Il faut choisir un bacille très virulent, la virulence de ce germe marchant en général de pair avec son pouvoir toxigène. Un bacille dont 1 centimètre cube de culture en bouillon tue un cobaye de 400 grammes en vingt-quatre ou trente-six heures en injection sous-cutanée est favorable à la production de la toxine.

2° *Conditions relevant du milieu de culture.* — On sait que le bouillon légèrement alcalin, ensemencé avec du Bacille diphtérique, devient acide pendant les premiers jours ; en même temps la culture cesse ; il redevient alcalin dans la suite, et la culture devient florissante et donne un voile. Or, tant que le milieu est acide, la toxicité est peu marquée ; elle augmente au contraire et atteint son maximum quand la réaction devient alcaline.

Tous les bactériologues ont donc cherché à diminuer ou même à supprimer cette période nocive d'acidité :

Park et Williams ont proposé d'utiliser un bouillon neutre, alcalinisé ensuite par 7 centimètres cubes de soude normale par litre.

Spronck, pensant que l'acidité était due à la présence de matières hydrocarbonées, prépara du bouillon avec de la viande fermentée, où ces produits avaient été transformés.

M. Nicolle utilisa au contraire la viande très fraîche pour éviter la transformation du glycogène en glycose.

D'autres procédés sont plus favorables pour éviter l'acidité : ce sont ceux de Roux et Yersin, puis celui récemment imaginé par L. Martin.

Procédé de Roux et Yersin (fig. 190). — Roux et Yersin ont réussi à diminuer la durée de la période d'alcalinité, en soumettant la surface de la culture à l'action constante d'un courant d'air.

Fig. 190. — Dispositif pour préparation de la toxine diphtérique (procédé Roux et Yersin).

Dans un ballon de Fernbach, on verse 400 à 500 centimètres cubes de bouillon de veau, répartis ainsi sur une épaisseur de 2 à 3 centimètres; les deux tubulures sont bouchées à la

ouate, et l'appareil est stérilisé à l'autoclave. On pratique l'ensemencement par la tubulure supérieure.

Au bout de vingt-quatre heures de séjour à l'étuve à 37°, le milieu est trouble. Il s'agit alors de faire passer le courant d'air. Pour cela, on adapte à la tubulure supérieure, au-dessus de la ouate, un bouchon de caoutchouc armé d'un tube de verre qui rejoint un barboteur, contenant de l'eau pour éviter l'évaporation lors du courant d'air. Pour assurer la production de ce dernier, on relie la tubulure latérale à une trompe à eau ; l'air passe alors en permanence à la surface du milieu.

Après trois semaines environ, la culture est très toxique ; la filtrer sur bougie Chamberland ; le filtrat constitue la toxine diphtérique ; un dixième de centimètre cube, inoculé sous la peau d'un cobaye de 300 à 400 grammes, le tue rapidement.

Procédé de L. Martin. — L. Martin utilise un milieu qui supprime entièrement la période d'acidité ; il a l'avantage de fournir rapidement une toxine très active : c'est le *bouillon de veau additionné de peptone Martin* (Voy. p. 119).

Après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve à 37°, un voile se forme à la surface ; il s'accuse et s'épaissit le deuxième jour ; le troisième, il tombe au fond du vase ; les jours suivants un nouveau voile se forme qui tombe vers le sixième jour. C'est habituellement le huitième jour que l'activité de la toxine atteint son maximum ; après ce délai, elle ne s'accroît plus ; elle diminue vers la fin de la deuxième semaine.

Il suffit ensuite de filtrer comme précédemment ; la toxine ainsi obtenue tue le cobaye à la dose de 1/200 de centimètre cube.

Effets expérimentaux de la toxine. — Injectée aux animaux sensibles à l'infection diphtérique, la toxine du Bacille de Löffler reproduit les mêmes effets que les cultures vivantes. Le cobaye, ici encore, est l'animal de choix pour cette étude.

Cobaye. — L'injection sous-cutanée d'une dose minime de toxine (1/4, 1/10 à 1/100 de centimètre cube), variable suivant le germe utilisé et le procédé de préparation, provoque tout d'abord de l'œdème au point d'inoculation ; puis, au bout de douze à vingt-quatre heures, son poil se hérisse ; l'animal est prostré et dyspnéique. Il succombe, suivant la dose employée, entre vingt-quatre heures et trois jours.

L'autopsie montre une congestion généralisée des ganglions et des viscères, portant surtout sur l'appareil rénal et particulièrement sur les capsules surrénales, très hyperémiées et gorgées de sang noirâtre ; dans les plèvres et le péricarde, on décèle un épanchement séreux.

Avec des doses moindres, non mortelles, l'animal présente un

léger œdème au point inoculé, puis il maigrit progressivement, se cachectise, et l'on observe alors parfois une *paralysie* du train postérieur.

Lapin. — Le lapin qui a reçu sous la peau ou dans les veines 1 à 4 centimètres cubes de toxine présente des phénomènes identiques. Si la dose utilisée n'est pas mortelle, les paralysies sont plus fréquentes que chez le cobaye.

L'autopsie montre les mêmes lésions. Molard et Regaud ont attiré l'attention sur la fréquence des lésions myocardiques, se traduisant par la nécrose des fibres musculaires. Notons en passant le rapprochement qui doit être fait avec la myocardite diphtérique humaine.

Sur le lapin, Roger et Bayeux, Coppez, Morax et Elmassian ont reproduit, sans traumatisme préalable, de véritables fausses membranes par la seule application de toxine à la surface des muqueuses.

Autres animaux. — Le *chien*, qui a reçu 1 centimètre cube de toxine sous la peau, succombe rapidement après avoir présenté de l'ictère et de la diarrhée. L'autopsie montre de la dégénérescence hépatique associée aux autres lésions viscérales classiques. Avec des doses faibles, on observe des paralysies.

Les *ruminants* (vache, chèvre, mouton, âne) sont assez sensibles au poison diphtérique. Le cheval semble un peu plus résistant.

Les *oiseaux* (poule, pigeon, moineaux, calfats) sont d'une extrême sensibilité. Ils succombent rapidement à l'inoculation d'une dose infinitésimale.

Le *rat* et la *souris* sont presque réfractaires, et cependant Roux et Borrel ont montré que l'injection intracérébrale d'un dixième de centimètre cube de toxine tuait rapidement le rat.

Propriétés de la toxine. — Les effets de la toxine diphtérique sont annihilés par un chauffage à 100° pendant vingt minutes. Soumise à la température de 70° pendant deux heures, elle reste de même inoffensive ; à 58° pendant le même temps, elle donne à peine un peu d'œdème chez le cobaye ; cet animal peut cependant succomber à la longue après avoir présenté des paralysies.

La toxine est encore très sensible à l'action de certaines substances chimiques qui diminuent notablement son activité. Mélangée à de l'acide tartrique, de l'acide lactique, une dose mortelle de toxine ne produit plus que de l'œdème au point d'inoculation ; la neutralisation de l'acide par un alcalin lui fait récupérer son énergie première.

Les oxydants la modifient comme les acides : le permanganate de potasse, l'eau oxygénée, l'ozone la rendent inoffensive. L'iode, le trichlorure d'iode agissent dans le même sens ; aussi ces sub-

stances ont-elles été utilisées pour affaiblir la toxine au début de la vaccination des animaux destinés à fournir du sérum antidiphtérique.

Cette toxine est précipitable enfin par certaines substances : 4 à 5 volumes d'alcool absolu ajoutés à 1 volume de toxine donnent un précipité abondant qui se dépose au fond du vase ; le précipité contient la toxine.

De même l'addition de sulfhydrate d'ammoniaque à saturation détermine la formation d'un précipité jaunâtre qui surnage à la surface du liquide sous l'aspect d'une couche jaunâtre qu'il est facile de recueillir ; le précipité desséché et lavé est toxique pour l'animal.

Il en est encore ainsi du chlorure de calcium ajouté goutte à goutte ; à la faveur des phosphates contenus dans le liquide, il se forme un précipité de phosphate de chaux ; on le recueille sur un filtre, on le lave ; un grain de cette substance, introduit sous la peau d'un cobaye, donne de l'œdème, et l'animal meurt rapidement. Ce précipité est très toxique à l'état humide : il perd de son activité une fois desséché, mais la toxine qu'il retient est moins sensible à l'action destructive de la chaleur.

L'extrait sec de la toxine, obtenu par dessiccation dans le vide, est très toxique. Débarrassé de ses impuretés par la dialyse, cet extrait est doué d'une toxicité considérable.

Nature de la toxine. — De nombreuses opinions ont été émises sur la nature de la toxine diphtérique :

Pour Brieger et Frænkel, elle serait identifiable à une *toxalbumine* et serait un dérivé des albumines contenues dans le milieu de culture. Elle présenterait, d'après eux, les réactions classiques des substances albuminoïdes vraies. En raison de l'influence destructive de la pepsine et de la trypsine sur la toxine diphtérique, ils font de cette dernière une *nucléoalbumine*.

Roux et Yersin ont été frappés par le parallélisme étroit qui existe entre les propriétés générales de la toxine diphtérique et celles des *diastases*, avec lesquelles ils l'ont comparée. Pour eux, il s'agissait d'un *produit soluble* sécrété par le Bacille diphtérique au cours de sa culture dans le milieu employé.

Ehrlich envisage la toxine diphtérique comme constituée par deux substances : l'une, la *toxine* proprement dite, l'autre la *toxone*, peu toxique. Toutes deux seraient neutralisables par l'antitoxine ; mais, d'après Madsen, l'intoxication aiguë relèverait de la première, alors que la seconde serait responsable des troubles plus tardifs de l'intoxication, les escarres, les paralysies notamment.

Les *toxoïdes*, troisième groupe de substances, apparaîtraient au contact de l'oxygène dans les cultures vieilles ; elles seraient très peu toxiques.

Enfin on a attiré récemment l'attention sur un poison particulier qui

serait retenu par les corps microbiens, l'*endotoxine*, à laquelle Rist est tenté d'attribuer la production des paralysies du voile du palais dans la diphtérie humaine. Cruveilhier l'a étudiée; elle ne serait pas neutralisable par l'antitoxine diphtérique.

BACILLE DIPHTÉRIQUE ET BACILLES DIPHTÉRIMORPHES.

A côté du Bacille diphtérique, d'autres germes ont été décrits, sur la nature desquels de multiples opinions ont été émises. En 1887, Löffler isola d'un cas d'angine diphtérique un Bacille présentant tous les caractères du Bacille diphtérique, mais dénué de virulence pour les animaux de laboratoire. En raison de son avirulence, il le crut différent du Bacille spécifique, et le dénomma Bacille « pseudo-diphtérique ». Ce fut le point de départ de discussions sans nombre, à l'occasion desquelles les savants se partagèrent en deux camps opposés: les uns, *dualistes*, partisans d'une séparation nette entre le Bacille diphtérique et ces Bacilles avirulents ; les autres, *unicistes*, pensant que ces derniers ne représentaient qu'une forme atténuée du Bacille diphtérique spécifique.

Or, Roux et Yersin, L. Martin ont démontré de la façon la plus formelle que cette absence de virulence n'est pas un caractère suffisant pour faire rejeter l'étiquette de « diphtérique » à un germe qui présente tous les autres caractères du Bacille de Löffler :

Si, d'une façon générale, le Bacille dit « pseudo-diphtérique », tel que le concevait Löffler, n'est pas virulent, il provoque cependant, chez le cobaye, dans un certain nombre de cas, de l'œdème au point d'inoculation et peut tuer le moineau. D'autre part, Roux et Yersin ont prouvé que certains Bacilles de Löffler légitimes, provenant d'angines diphtériques, et recueillis à des périodes différentes de l'infection, subissent une atténuation progressive de leur virulence au fur et à mesure que la diphtérie évolue vers la guérison : un Bacille très virulent peut, après un certain temps, s'atténuer au point de ne plus donner au cobaye que de l'œdème, et devenir même complètement avirulent.

Puis, ces savants ont pu faire récupérer la virulence à un germe ne donnant que de l'œdème au cobaye, en l'associant au Streptocoque. Il est vrai qu'ils n'ont pu rendre virulent un bacille complètement inactif.

Mais une expérience de L. Martin est bien de nature à prouver la nature diphtérique de ces germes à virulence très atténuée ; une culture en bouillon d'un Bacille très virulent, conservée à l'étuve depuis huit mois, est réensemencée en bouillon sans résultat; réen-

semencée en gélose recouverte de bouillon de veau, elle donne lieu à une culture d'un Bacille court qui reste court lors des passages suivants, ne donne au cobaye qu'un œdème passager, mais tue le moineau; cet animal est d'ailleurs préservé par une injection préventive de sérum antidiphtérique.

D'ailleurs la toxine produite par ces germes « dégénérés » présente les caractères et les propriétés de la toxine diphtérique; celle-ci est notamment neutralisée par le sérum antidiphtérique antitoxique.

De cet ensemble de faits on peut donc conclure avec Roux et Yersin qu'il convient de n'attacher que fort peu d'importance au caractère « virulence » pour la différenciation de ces germes ; entre les bacilles virulents et les Bacilles avirulents, il existe des Bacilles à tous les degrés de virulence. Cette dernière est une propriété contingente que peuvent perdre certains germes spécifiques sans perdre pour cela leur spécificité. C'est ce que L. Martin soutenait encore récemment en disant qu'il n'y a pas lieu d'établir une différence basée sur la virulence, les Bacilles ayant tous les caractères du diphtérique, longs, courts ou moyens, virulents ou non virulents, sont tous des diphtériques. Le germe décrit par Löffler sous le nom de « pseudo-diphtérique » n'est donc autre qu'un Bacille diphtérique atténué.

Il semble que l'accord se serait facilement établi sur cette question si certains savants et, à leur suite, un grand nombre de bactériologistes, n'avaient assimilé indûment à ces Bacilles virulents et avirulents, certains autres Bacilles diphtérimorphes, auxquels ils réservèrent l'étiquette inexacte de « pseudo-diphtériques ».

En effet, on est arrivé à désigner sous ce nom tout un groupe de germes ressemblant au Bacille de Löffler, notamment dans sa forme courte, et plus particulièrement au Bacille décrit par Hoffmann, que l'on retrouve si fréquemment dans la gorge et sur les muqueuses d'une foule de sujets sains. Or ce germe, malgré ses analogies morphologiques apparentes (à un examen superficiel) avec la forme courte du Bacille de Löffler, se sépare totalement, non seulement du diphtérique virulent, mais aussi du diphtérique avirulent (ancien pseudo-diphtérique de Löffler) ; suivant l'expression de L. Martin, « il n'a rien de diphtérique ». L. Martin et Loiseau ont d'ailleurs achevé récemment de le démontrer en mettant en évidence la faculté que possède le Bacille de Löffler, virulent ou non, de pousser en anaérobiose, en opposition avec l'aérobiose exclusive des cultures du Bacille d'Hoffmann. Costa, Troisier et Dauvergne ont complété cette démonstration par la mise en valeur des fermen-

tations sucrées et des différences du pouvoir hémotoxique de chacun d'eux.

Voici d'ailleurs les caractères essentiels du Bacille d'Hoffmann.

Bacille d'Hoffmann. — *Aspect morphologique.* — Le Bacille d'Hoffmann, connu sous le terme inexact de « pseudo-diphtérique », est un bâtonnet généralement court, ressemblant à la forme courte du Bacille de Löffler. En certaines cultures on ne perçoit que les formes précédentes, mais en d'autres ce Bacille semble polymorphe; une même

Fig. 191. — A gauche, bacilles diphtériques courts. A droite, bacilles d'Hoffmann (formes en navette), d'après des photographies de L. Martin et Loiseau.

colonie peut renfermer, avec des Bacilles courts, des Bacilles plus longs, dont la présence peut devenir embarrassante pour l'interprétation à en donner.

Les Bacilles d'Hoffmann se groupent en V ou en amas qui paraissent généralement moins denses que ceux du diphtérique. Alors que les palissades de ce dernier semblent quelque peu disloquées, celles du Bacille d'Hoffmann sont plus régulières, et les germes les plus longs sont disposés deux à deux, parallèlement, aspect exceptionnel avec le Bacille de Löffler.

Un examen microscopique approfondi fait remarquer, contrairement au Bacille de Löffler, un aspect trapu: le corps est un peu renflé, les extrémités sont un peu effilées; il revêt l'aspect d'une *navette*, ou d'un *grain d'orge* (L. Martin).

La coloration est la même que celle du Bacille diphtérique, mais le Bacille d'Hoffmann, à condition qu'il provienne de cultures âgées de vingt-

quatre à quarante-huit heures, résiste davantage que ce dernier à l'action de l'alcool absolu et de l'alcool-acétone.

Le Bacille d'Hoffmann ne présente pas, en général, l'aspect granuleux du diphtérique; les granulations qu'il renferme parfois sont peu nombreuses. La plupart du temps, les granulations polaires de Neisser n'existent pas; certains échantillons appartenant aux formes longues peuvent cependant en être pourvus, mais elles sont généralement moins nettes que celles du diphtérique (Aviragnet).

Cultures. — Sur *sérum coagulé*, les colonies apparaissent en quinze à vingt heures à la température de 37°. Elles sont plus humides, plus crémeuses que celles du Löffler, et présentent une teinte jaunâtre; au lieu d'être rondes et à contours réguliers, elles sont ovales, allongées dans le sens de l'axe du tube (L. Martin); leurs contours sont irréguliers et festonnés.

Sur *gélose or linaire*, il pousse plus abondamment et plus vite que le diphtérique; les colonies sont nettement perceptibles à l'œil nu à un moment où les colonies de Löffler ne sont visibles qu'à la loupe. Escherich a signalé une coloration brunâtre du milieu; mais ce caractère semble varier suivant la composition de ce dernier.

Sur *gélatine*, il se développe assez facilement, donnant une couche blanchâtre, crémeuse.

En *bouillon*, la culture est abondante dès le début; le trouble produit est homogène; mais il n'existe pas de voile à la surface; tout au plus se forme-t-il une collerette adhérente aux parois du tube. Le Bacille d'Hoffmann ne développe dans le milieu aucune acidité; deux à trois jours après l'ensemencement, l'alcalinité est même plus forte qu'au début, alors que la culture du diphtérique à cette époque est déjà acide.

En gélose sucrée anaérobie, le Bacille d'Hoffmann ne pousse qu'à la surface: on constate un semis qui se cantonne uniquement dans le centimètre supérieur du milieu; dans les jours qui suivent, ces colonies continuent à se développer, formant une couche blanchâtre qui s'étale à la surface; aucune colonie n'est perceptible dans la profondeur.

Fermentations sucrées. — Ce germe ne possède *aucune action fermentative sur les sucres*; les milieux sucrés tournesolés dans lesquels il cultive gardent leur teinte bleue primitive.

Action hémotoxique. — D'après Costa, Troisier et Dauvergne, le Bacille d'Hoffmann ne possède aucune action hémotoxique.

Action expérimentale. — La plupart du temps, les injections sous-cutanées des cultures de ce germe ne provoquent chez le cobaye aucun phénomène appréciable. En certains cas cependant, Spronck a constaté la production d'un léger œdème au point d'inoculation, disparaissant d'ailleurs facilement après quarante-huit heures.

Cette particularité semblerait le rapprocher des Bacilles diphtériques devenus presque avirulents; toutefois cet œdème prend naissance malgré une injection préventive de sérum antidiphtérique.

Ce court exposé montre les différences essentielles qui séparent le Bacille d'Hoffmann du Bacille diphtérique, même avirulent. Au point de vue botanique donc, il ne peut être rapproché de ce dernier, encore moins lui être assimilé. C'est donc à tort qu'on l'a

nommé pseudo-diphtérique. Pour éviter de nouvelles confusions, L. Martin a proposé d'ailleurs de supprimer cette étiquette trompeuse, et de lui réserver celle de *Coryne bacterium commune*, par opposition à celle de *Coryne bacterium diphteriæ* qui convient au seul Bacille de Löffler, virulent ou avirulent.

Aucun doute ne saurait donc plus subsister sur l'interprétation à donner concernant les rapports du Bacille d'Hoffmann et du Bacille diphtérique. Il existe un Bacille de Löffler, spécifique de la diphtérie, présentant des degrés variables de virulence pouvant aller jusqu'à l'avirulence, et en regard un Bacille différent, décrit par Hoffmann, pouvant se rencontrer fréquemment au niveau des muqueuses buccale, pharyngée, etc., isolément ou à côté du diphtérique, mais n'étant qu'un saprophyte vulgaire et totalement étranger à la diphtérie. C'est en ce sens que doit être résolu le problème qui a, jusqu'à ces dernières années, divisé les bactériologistes.

Cette solution présente un certain intérêt pratique en raison des erreurs si fréquemment commises lors de la recherche des porteurs de germes et des conclusions qu'il faut tirer quand on se trouve en présence de ces Bacilles sur la nature desquels les auteurs sont en plein désaccord.

Parmi les germes diphtérimorphes, il faut compter encore le *Bacillus cutis communis* et le *Bacille de la xérose conjonctivale.*

Bacillus cutis communis. — C'est un bâtonnet polymorphe revêtant l'aspect général du Bacille de Löffler ; formes longues, mais plus allongées que celles de ce dernier, se terminant en massue; de même aussi formes moyennes, et formes courtes d'aspect cocco-bacillaire.

Il se rencontre à l'état normal dans les fosses nasales, sur la conjonctive, la peau, parfois dans les urines.

Il reste coloré par la méthode de Gram ; d'après Costa, Troisier et Dauvergne, il arrive à se décolorer en même temps que le diphtérique. Il contient des granulations polaires comme ce dernier.

Les cultures sont habituellement riches : le bouillon se trouble fortement avec un dépôt abondant: sur sérum les colonies poussent avec exubérance.

En *anaérobiose*, par le procédé de L. Martin et Loiseau, *Bacillus cutis communis* pousse en général à la fois en profondeur comme le diphtérique, et en surface, comme le Bacille d'Hoffmann. Toutefois, certains échantillons poussent de préférence dans la zone d'aérobiose, et d'autres de préférence en anaérobiose, caractère qui les rapproche du diphtérique.

L'*action fermentative sur les sucres* est assez variable. Il est certains *B. cutis* qui ne font fermenter aucun sucre ; d'autres fermentent la glucose et la lévulose à la manière du diphtérique, mais la maltose d'une façon inconstante (certains ne l'attaquent pas, d'autres brunissent le milieu, d'autres le rougissent, mais d'une façon passagère) ; enfin lactose et

mannite ne fermentent jamais. Il est donc certaines races de *B. cutis* dont l'action fermentative rappelle celle du Bacille de Löffler; ce qui l'en distingue, c'est la fermentation de la saccharose, du moins quand on emploie la couleur bleu horizon de Costa et de ses collaborateurs.

Sur ce milieu, quand il est glucosé, les colonies sont exubérantes, bombées, ombiliquées; leur centre fait saillie et prend une teinte jaunâtre; la périphérie est crénelée ou dentelée.

L'action hémotoxique, en outre, est la plupart du temps négative; quand elle est positive, elle ne se montre pas avant le cinquième jour.

Bacille de la xérose conjonctivale. — Il semble se rapprocher assez étroitement du *Bacillus cutis*, sans, toutefois, l'abondance ni l'exubérance des cultures qui sont généralement grêles; les colonies sont sèches; les propriétés bio-chimiques sont celles du germe précédent.

Comme le B. d'Hoffmann, le *B. cutis communis* et celui du xérosis n'ont rien de diphtérique.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE.

L'examen clinique ne renseigne pas toujours exactement sur la véritable nature d'un processus pseudo-membraneux ; le secours du laboratoire est le plus souvent nécessaire. Il est à plus forte raison indispensable quand le Bacille de Löffler ne provoque qu'une inflammation d'apparence banale, sans production d'exsudat pseudo-membraneux.

Technique du prélèvement. — C'est au niveau de la *gorge* qu'on est appelé le plus souvent à prélever l'exsudat pseudo-membraneux : à l'aide d'un tampon d'ouate stérilisé, monté sur une tige métallique ou un agitateur de verre, on détache doucement, avec le moins de traumatisme possible, la fausse membrane à examiner. Si cette dernière est adhérente, on peut la recueillir à l'aide d'une pince, en faisant son possible pour éviter tout saignement de la muqueuse sous-jacente.

S'il n'existe pas d'exsudat, on frotte légèrement la surface de la muqueuse à l'aide du tampon d'ouate, de préférence au niveau d'un pilier dans la fosse amygdalienne.

En cas de *rhinite* supposée diphtérique, se servir d'un écouvillon d'ouate monté sur fil métallique coudé ; on l'introduit derrière le voile du palais, et l'on frotte à l'aide du tampon la surface de la muqueuse rhino-pharyngée (Voy. *Méningocoque*, p, 336).

S'il s'agit de *croup* sans angine, recueillir simplement des fragments pseudo-membraneux expulsés par la toux; s'il n'en existe pas, recueillir du mucus au niveau de la base de l'épiglotte ou l'orifice supérieur du larynx.

Pour une diphtérie de la *peau* ou des *muqueuses externes* (conjonctive, vulve, prépuce, etc.), la technique est la même.

Si l'examen ne peut être effectué sur place, expédier la fausse membrane au laboratoire le plus proche. L'envoi doit être fait dans un tube stérile, rigoureusement bouché pour éviter la dessiccation.

Examen microscopique direct. — Débarrasser tout d'abord la surface de la fausse membrane du mucus, de la salive et des impuretés qu'elle véhicule, en la comprimant entre deux feuilles de papier-filtre.

Faire ensuite des frottis en couche mince et uniforme. Laisser sécher, fixer et colorer.

Colorer une lame par la méthode de Gram avec suraddition de fuchsine diluée.

En cas de diphtérie, l'examen montre des bacilles prenant le

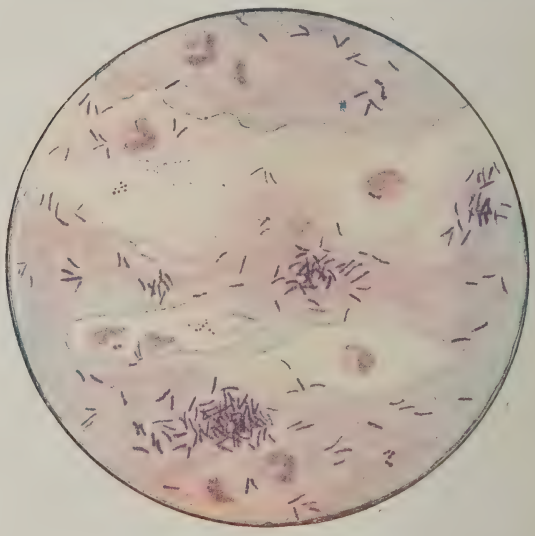

Fig. 192. — Frottis de fausse membrane diphtérique (coloration par le Gram composé). Buissons de Bacilles de Löffler, quelques cocci associés.

Gram, légèrement incurvés, disposés souvent en broussailles (fig. 192), présentant en un mot l'aspect morphologique du Bacille de Löffler. Il est presque constant de constater, à côté de ce dernier, des cocci, bâtonnets, etc., dont l'examen ne doit pas être négligé en raison des associations secondaires qui aggravent souvent le pronostic.

Néanmoins la présence de bacilles dont la forme rappelle celle du Bacille de Löffler est insuffisante pour affirmer le diagnostic de diphtérie ; la mise en culture est indispensable pour bien les identifier.

Inversement l'absence de bacilles ressemblant au Bacille diphté-

rique ne doit pas faire éliminer d'emblée le diagnostic de diphtérie. Ces germes présents dans la fausse membrane peuvent ne pas être abondants dans les frottis (faute de technique parfois), et être mélangés à une foule d'autres bactéries empêchant de les distinguer nettement. Ici encore, il est indispensable de recourir à la culture.

Isolement. — L'isolement a pour but de séparer le Bacille diphtérique de tous les germes étrangers au Bacille de Löffler. Il doit s'effectuer par ensemencement sur les milieux électifs pour le Bacille de Löffler. Le sérum coagulé de cheval ou de bœuf présente le grand avantage de convenir très bien au développement de ce germe, et beaucoup moins aux autres, dont les colonies apparaissent plus tardivement. (Sur sérum peptoné de Löffler, au contraire, tous les germes poussent abondamment et se développent simultanément ; l'isolement devient alors plus malaisé).

A défaut de sérum, on peut utiliser l'albumine d'œuf coagulée.

Ensemencer à l'aide d'une *spatule* chargée d'une parcelle de la fausse membrane prélevée. On ensemence ainsi toute la surface d'un premier tube de sérum, et au besoin d'un deuxième, sans recharger la spatule.

La pratique qui consiste à ensemencer directement avec le tampon de coton qui a servi au prélèvement est à rejeter ; la culture est alors trop abondante, les colonies sont confluentes ; leurs caractères distinctifs ne sont plus nettement perceptibles,

Les tubes de sérum sont portés à l'étuve à 37°. Les colonies du Bacille diphtérique sont perceptibles déjà au bout de dix-huit heures; elles sont bien développées après vingt-quatre à trente-six heures.

Identification. — L'identification des colonies qui ont poussé s'effectue par l'examen macroscopique et microscopique de ces dernières.

L'examen macroscopique, à l'œil nu ou à la loupe, détermine leurs caractères.

De celles qui semblent appartenir au diphtérique, prélever une parcelle que l'on dilue dans une gouttelette d'eau déposée sur une lame.

Rappelons que, sur sérum coagulé :

Les colonies de Bacille de Löffler sont blanches, opaques, surélevées en leur centre, et *sèches*.

Les colonies de Bacille d'Hoffmann sont légèrement jaunâtres, aplaties, *humides*.

Les colonies de Streptocoque se différencient des précédentes en ce qu'elles sont plus fines et en grains de semoule; les colonies de

Staphylocoque sont jaunes (staphylocoque doré) ou blanches (staphylocoque blanc), aplaties et d'aspect porcelainé.

Avec un peu d'éducation visuelle, on reconnaît facilement celles qui appartiennent à ces derniers germes ; on peut ainsi les éliminer d'emblée de l'examen ; il faut être plus exercé pour différencier ainsi les colonies de Löffler de celles du Bacille d'Hoffmann.

Quand l'œil n'est pas encore très exercé à distinguer les colonies suspectes, il est indispensable de prélever séparément plusieurs d'entre elles pour les soumettre à l'examen microscopique ; car si l'examen ne porte que sur une seule, on risque de laisser passer inaperçues des colonies voisines de diphtérique ; il convient aussi d'éviter de prélever avec le fil de platine plusieurs colonies à la fois.

Laisser sécher les émulsions ainsi effectuées. Colorer par la méthode de Gram.

S'il s'agit du Bacille de Löffler à forme longue ou moyenne, avec son aspect morphologique caractéristique, le diagnostic s'impose d'emblée, et point n'est besoin de recourir à des méthodes d'identification plus précises. Mais si le germe examiné revêt la forme courte, il peut s'agir soit d'un Bacille diphtérique court, soit d'un bacille diphtérimorphe ; il importe de les différencier par les procédés actuellement en usage (Voir : *Recherche des porteurs de germes*, page 439.)

Néanmoins si le malade présente les caractères cliniques de la diphtérie, et pour ne pas lui faire perdre le bénéfice d'une sérothérapie précoce, il sera prudent de donner au clinicien une réponse positive, quitte à poursuivre ultérieurement l'identification et à rectifier l'erreur s'il y a lieu. Libeller ainsi la réponse : « Bacille diphtérique court, l'identification complète sera poursuivie. »

Recherche des germes d'association secondaire, — Le diagnostic de diphtérie doit souvent être complété par la recherche des germes associés, dont quelques-uns, comme le Streptocoque, le Staphylocoque, aggravent le pronostic.

En principe, il conviendrait donc d'examiner et d'identifier les colonies qui ont poussé sur les tubes de culture ensemencés avec la ausse membrane ; mais ils peuvent pousser à côté du Bacille de Löffler, même quand il ne s'agit pas de diphtérie « associée ». En ce cas, il est vrai, les colonies qu'ils fournissent sont rares.

Pour porter le diagnostic de diphtérie associée, il faut que les olonies des germes associés soient abondantes (L. Martin). Encore ans cette abondance existe-t-il des degrés qui, d'après Widal et Bezançon, peuvent aussi bien provenir d'un hasard du prélèvement.

RECHERCHE DES PORTEURS DE GERMES.

La recherche des porteurs de germes, sains ou convalescents, est infiniment plus délicate, surtout en raison de la présence fréquente, au niveau des muqueuses buccale et pharyngée, des bactéries diphtérimorphes qu'il importe de différencier du Bacille diphtérique. Leur identification réclame des épreuves spéciales qu'il importe de bien connaître.

Les différents points de cette technique sont les suivants :

1° **Prélèvement.** — Prélever le mucus pharyngé à l'aide d'un tampon d'ouate stérile monté sur tige métallique avec lequel on frotte légèrement la surface de la muqueuse, comme il a été dit plus haut. Il est rarement utile d'opérer le prélèvement à la fois sur la muqueuse rhino-pharyngée et la muqueuse de la gorge.

2° **Isolement du Bacille diphtérique.** — Destiné à séparer le Bacille diphtérique de toutes les bactéries étrangères, diphtérimorphes ou autres, il s'effectue, comme dans les cas de diphtérie, à l'aide d'une spatule chargée d'une parcelle de mucus recueillie par le tampon d'ouate.

Ensemencer un ou deux tubes de sérum coagulé, comme précédemment, et porter à l'étuve à 37°. Les colonies apparaissent en dix-huit heures, mais sont nettes après vingt-quatre à trente-six heures.

Identification. — *Examen des colonies.* — Si l'ensemencement a été pratiqué suivant les règles énoncées ci-dessus, un certain nombre de colonies sont bien isolées et faciles à caractériser.

Elles doivent être examinées tout d'abord à l'œil nu et à la loupe, pour essayer de distinguer déjà si elles appartiennent au Bacille diphtérique ou aux diphtérimorphes. Donc bien observer leurs caractères.

Examen des germes. — Prélever une parcelle d'une colonie considérée comme suspecte ; l'émulsionner dans une gouttelette d'eau versée sur une lame de verre. Laisser sécher, fixer, colorer par la méthode de Gram. Examiner au microscope.

Rappelons ici l'aspect en cornichon ou en haltère du Bacille diphtérique et l'aspect en navette ou en grain d'orge du Bacille d'Hoffmann, et les différences qui les séparent dans l'état granuleux.

Mais le plus souvent ces caractères morphologiques sont insuffisants pour la détermination à effectuer ; il faut, dans ce but, recourir à l'une des méthodes suivantes :

Procédé de la décoloration. — Ce procédé, dû à Roeh et Meros,

consiste à éprouver la résistance du Bacille de Löffler et des germes similaires à l'action décolorante de l'alcool absolu ou de l'alcool-acétone après coloration par la méthode de Gram.

Dans ce but, utiliser des cultures jeunes de vingt-quatre à quarante-huit heures; les colorer par la méthode de Gram classique et décolorer comme à l'ordinaire par l'alcool absolu ou l'alcool-acétone. Bien noter le moment où l'alcool est versé sur les préparations :

Le Bacille diphtérique se décolore au plus tard après une minute de contact ; les germes similaires ne se décolorent qu'après dix minutes du même contact.

Procédé des cultures anaérobies de L. Martin et Loiseau. — Ce procédé est basé sur ce fait que le Bacille diphtérique pousse en culture anaérobie, dans la profondeur des tubes de gélose profonde, alors que les diphtérimorphes sont strictement aérobies et poussent uniquement à la surface du milieu.

Pour opérer la différenciation on procède de la façon suivante :

Choisir une colonie bien isolée et pure; en prélever une parcelle que l'on dilue dans un tube contenant 10 centimètres cubes de bouillon stérile, après l'avoir émulsionnée contre la paroi du tube. Agiter le tube pour obtenir une répartition uniforme. Faire subir au germe l'une des deux épreuves suivantes :

Cultures en gélose glucosée de Veillon. — On a préparé préalablement de la gélose glucosée de Veillon, que l'on a répartie en tubes sur 10 à 12 centimètres de hauteur.

Faire fondre au bain-marie la gélose d'un tube de culture ; refroidir rapidement à 50°. Prélever à l'aide d'une pipette stérile 1 centimètre cube de bouillon contenant l'émulsion du Bacille à identifier ; mélanger soigneusement. Refroidir le tube et le placer à l'étuve à 37°.

S'il s'agit du Bacille diphtérique, on constate, après 15 à 18 heures, à l'œil nu et mieux à la loupe, un semis abondant de colonies, *uniformément réparties sur toute la hauteur du tube*, aussi bien à la surface que dans la profondeur, et sans prédominance dans la zone d'aérobiose ; les colonies les plus voisines de la surface ne s'étalent pas à l'air libre, même si on abandonne pendant plusieurs jours les tubes à la température du laboratoire.

S'il s'agit d'un bacille seulement diphtérimorphe, *les colonies se cantonnent uniquement dans le centimètre supérieur du milieu* ; elles sont plus particulièrement abondantes *sur une épaisseur de 2 à 3 millimètres avoisinant l'air libre ;* le reste du tube est complètement dénué de colonies. Quand on examine ces tubes après huit à dix jours de séjour à la température du laboratoire, ces colonies en-

vahissent la surface libre de la gélose et s'étalent à la surface, sous forme d'une couche épaisse et crémeuse.

Cultures en gélose profonde glucosée tournesolée. — La différenciation est encore plus nette quand on utilise la gélose profonde glucosée, additionnée de tournesol.

Celle-ci est préparée de la façon suivante :

1° Préparer de la gélose ordinaire à 3 p. 100, que l'on répartit en tubes à essais sur 6 centimètres de hauteur environ. Stériliser à l'autoclave.

2° Préparer une solution glucosée :

Eau distillée	200 cent. cubes.
Glucose	3 grammes.
Teinture de tournesol (Poulenc)	30 cent. cubes.

En cas de besoin, si le milieu tend à virer au rouge, alcaliniser légèrement ; stériliser par filtration sur bougie.

3° Faire fondre la gélose répartie en tubes, refroidir ces derniers à 50° environ. Répartir la solution glucosée dans chaque tube (5 centimètres cubes par tube). Bien mélanger pour obtenir une teinte uniforme bleu violacé. Refroidir. Éprouver la stérilité par un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°.

Pour utiliser le milieu, faire fondre la gélose au bain-marie et ensemencer, comme précédemment, 1 centimètre cube de bouillon où la colonie à identifier aura été émulsionnée. Porter à l'étuve à 37°.

Si le Bacille est diphtérique, la fermentation de la glucose se sera effectuée et le milieu aura viré au rouge. Les colonies sont d'ailleurs visibles sur toute la hauteur, comme précédemment.

S'il s'agit d'un non-diphtérique, le milieu garde sa teinte bleu violacé ou devient même bleu franc ; les colonies sont abondantes à la surface, et absentes dans la profondeur.

Pour que ces milieux donnent les résultats espérés, il est de première nécessité que la colonie sur laquelle on opère soit pure, sous peine de voir les résultats faussés par des souillures. Il convient donc toujours de s'assurer préalablement de l'absence d'impuretés, et en ce cas, fréquent d'ailleurs, de faire une séparation préalable.

Procédé de Costa, J. Troisier et Dauvergne. — Le procédé préconisé par ces auteurs présente l'avantage de réunir en une seule et même technique l'*isolement* et la *détermination* du germe à identifier. Il est basé sur les propriétés fermentatives exercées sur la glucose par le Bacille diphtérique, glucose qui est incorporée au sérum, additionné de tournesol et d'acide sulfurique ; ce dernier

acide a pour but de saturer partiellement l'alcalinité naturelle du sérum. L'addition d'acide et de glucose ne modifie pas le caractère électif du milieu.

Le milieu, dit « milieu horizon », est constitué par:

Sérum de cheval	100 cent. cubes.
Solution de glucose à 30 p. 100, stérilisée	10 —
Teinture de tournesol concentrée et stérilisée	XXX gouttes.
Solution d'acide sulfurique à 10 gr. p. 1000, stérilisée	3 cent. cubes.

Tous ces produits sont mélangés et répartis en boîtes de Petri, à fond régulièrement plat, à raison de 10 à 12 centimètres cubes par boîte.

On obtient la coagulation soit dans une étuve à sérum, soit à l'autoclave, soit à l'étuve de Gay-Lussac. Les auteurs emploient de préférence l'étuve sèche de Poupinel. On élève la température lentement et progressivement. Quand elle a atteint 75°, on la maintient à 80° pendant 1 heure 15. Rejeter ensuite l'eau de condensation; les boîtes peuvent être utilisées immédiatement. Le milieu doit être « bleu horizon » et de consistance ferme et élastique.

Les boîtes de Petri sont ensemencées à l'aide d'une *anse de platine triangulaire* qu'on a simplement appliquée contre le tampon du côté ayant servi au prélèvement. D'un mouvement de va-et-vient, on essuie l'anse ainsi chargée sur toute la surface du milieu, en procédant par segments parallèles et sans la recharger. On porte les boîtes à l'étuve à 37°, où elles sont placées, le couvercle en dessous.

Au bout de vingt-quatre heures, on observe les caractères des colonies qui ont poussé :

Les colonies du Bacille diphtérique, grosses comme une tête d'épingle, sont rouges au centre, roses à la périphérie ; elles sont assez transparentes pour que, vues à la loupe, contre une fenêtre, « elles donnent l'image des travées, sous la forme d'une petite croix. Légèrement globuleuses, de consistance plutôt ferme, elles s'enfoncent dans le milieu à la façon de clous de tapissier. »

Les colonies des Bacilles diphtérimorphes sont plus étalées, opaques, et présentent une teinte blanc grisâtre.

Quand, quelques heures après, elles sont plus développées, les différences s'accusent encore:

Celles du Bacille diphtérique restent circulaires; quand elles atteignent 3 à 4 millimètres de diamètre, leur centre se déprime et

s'ombilique ; elles ressemblent alors à une pustule variolique ; la coloration rouge se fonce.

Les colonies du deuxième groupe conservent la teinte précédente, elles prennent une forme irrégulière, ovalaire ou losangique avec des bords dentelés ou crénelés, leur consistance est molle, la zone centrale est surélevée et s'abaisse progressivement vers la périphérie.

Sur ce milieu, quand il a été correctement préparé, le développement des autres germes de la bouche est nettement retardé.

Enfin cet isolement doit être complété par l'examen des colonies rouges, les seules parmi lesquelles peut se trouver le Bacille diphtérique ; une parcelle en est diluée dans une gouttelette d'eau versée sur une lame pour être soumise à la coloration par le Gram. Cette technique, jointe aux caractères de fermentation obtenus d'emblée par cette méthode, permet d'affirmer la nature des bacilles qui ont poussé.

Cet examen direct est indispensable pour éliminer les colonies de Streptocoques et Pneumocoques qui donnent aussi des colonies roses, mais punctiformes ; de même aussi le Staphylocoque qui se montre parfois ; les colonies de ce dernier peuvent rougir le milieu, mais gardent leur teinte habituelle ; l'examen révélant la présence de cocci lève tous les doutes.

Ce procédé présente des avantages incontestables : il permet notamment d'obtenir des colonies nettement isolées et pures d'emblée, dont le simple examen permet d'affirmer le diagnostic ; mais le milieu demande à être préparé exactement comme les auteurs l'ont défini ; il ne réussit que s'il est coulé en boîtes de Petri ; coulé en tubes, même larges, il donne des résultats inconstants.

D'autre part, l'ensemencement à l'aide de l'anse triangulaire est parfois peu abondant ; il est bon de pratiquer conjointement l'isolement sur tubes de sérum à l'aide de la spatule.

Enfin, pas plus que les autres, il ne renseigne sur la différenciation d'avec le *B. cutis communis* qui ne peut être déterminé que par des épreuves supplémentaires (fermentation de la saccharose ou absence de pouvoir hémotoxique). En réalité, à part quelques exceptions, ces épreuves paraissent superflues car ce germe saprophyte se rencontre exceptionnellement sur la muqueuse pharyngée ; elles ne semblent avoir de raison d'être que dans les cas où l'on soupçonne une diphtérie cutanée.

Les procédés de détermination microbienne qui viennent d'être décrits permettent d'établir une différenciation nette entre les por-

teurs de bacilles diphtériques vrais, les seuls importants à déceler, car seuls ils sont dangereux pour la collectivité, et les sujets porteurs de bactéries diphtérimorphes qui n'ont aucun intérêt pour la prophylaxie, car elles sont incapables de propager la diphtérie.

A ce titre, ces nouvelles méthodes ont apporté un progrès considérable dans l'application de mesures prophylactiques rationnelles. Avant qu'elles ne fussent connues, en effet, et dans l'impossibilité où l'on se trouvait de distinguer pratiquement un diphtérique court d'un diphtériforme, tout sujet chez lequel on décelait la présence d'un bacille court poussant sur sérum et prenant le Gram, diphtérique ou non, était considéré, par mesure de prudence, comme un porteur de bacilles diphtériques et soumis comme tel à l'isolement. On arrivait ainsi à étiqueter « porteurs » 20, 30, 50 et même 70 p. 100 des sujets constituant une agglomération; c'était la faillite de la prophylaxie. Actuellement cette proportion des « porteurs » dépistés par les nouvelles méthodes ne s'élève plus qu'à des taux oscillant entre 1 et 5 p. 100; ces dernières permettent donc de conserver à la recherche de tels sujets toute sa valeur prophylactique.

IMMUNITÉ.

Une première atteinte de diphtérie ne confère habituellement pas l'immunité : témoin les rechutes et les récidives qu'on observe assez couramment. L'immunité acquise semble donc pour le moins exceptionnelle.

D'autre part, il semble bien qu'il existe chez certains sujets une immunité naturelle : dans un milieu contaminé, en effet, la diphtérie ne frappe pas également tous les individus, les très jeunes enfants et les adultes étant généralement plus épargnés que les enfants de cinq à dix ans.

Marx, en effet, a pu démontrer la présence d'antitoxine dans le sérum de sujets sains, notamment chez les nourrissons ; cette antitoxine disparaît après la première année et réapparaît après quinze ans. Il opérait en injectant au cobaye un mélange de toxine à une dose capable de donner seulement de l'œdème au cobaye et de sérum.

En 1913, Schick reprit la question par l'*intradermo-réaction*, effectuée sur des sujets sains à l'aide d'une dose très faible de toxine diphtérique.

Chez ceux dont les humeurs contiennent de l'antitoxine, il ne se produit aucune réaction ; la réaction est positive au contraire en cas d'absence d'antitoxine : en ce cas, vingt-quatre heures après l'injec-

tion, il se produit un halo rouge induré qui s'accroît jusqu'à la quarante-huitième heure et persiste, en s'affaiblissant, pendant une semaine environ.

La méthode de Schick fournit pour l'immunité naturelle des résultats comparables à ceux que Marx a obtenus.

Chez les malades atteints de diphtérie, la réaction est toujours positive; si l'affection est grave, l'épreuve reste positive pendant longtemps, prouvant que l'immunité est longue à s'établir; si elle est bénigne, l'immunité s'établit très vite. Si la sérothérapie est pratiquée quatre semaines après les injections de sérum, la réaction est positive dans 24 p. 100 des cas (Moody), montrant chez eux, déjà après ce délai, la perte de l'immunité ; les autres peuvent conserver un état réfractaire pendant longtemps.

Chez les porteurs de germes, l'épreuve de Schick est habituellement négative, montrant donc une immunité acquise par l'infection atténuée qu'ils ont présentée antérieurement pour la plupart.

Par conséquent, malgré les apparences, la diphtérie peut conférer parfois un certain degré d'immunité acquise.

SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE.

Sérum antitoxique.

Vaccination des animaux. — Préparation du sérum. — La vaccination des animaux s'obtient en injectant sous la peau, à intervalles espacés, des doses d'abord faibles de toxine atténuée par le trichlorure d'iode (Behring) ou la liqueur de Gram Roux, Nocard, L. Martin), puis de toxine pure, enfin des doses plus ou moins considérables.

Les animaux de laboratoire subissent difficilement l'accoutumance au poison diphtérique; ils se cachectisent à la longue et succombent.

Les grands animaux (moutons, chèvres, âne, cheval) sont plus faciles à immuniser. Nous insisterons uniquement sur la vaccination du cheval, la plus intéressante au point de vue de la préparation du sérum.

On choisit un cheval jeune, de six à dix ans, sans tare organique; on lui pratique sous la peau de l'encolure des injections successives de toxine, dans les conditions déterminées par le tableau devenu classique, indiqué par Roux et Nocard. Il s'agit d'un cheval ayant été injecté avec une toxine, dont 1/10 de centimètre cube tuait un cobaye de 400 à 500 grammes en quarante-huit heures. Au début, la toxine est mélangée avec 1/10 de liqueur de Gram; plus tard, elle est injectée seule.

1er	jour.	1/4 cent. cube de toxine iodée.		Pas de réaction, ni locale ni générale.		
2e	—	1/2	—	—	—	—
4e, 6e, 8e	—	1/2	—	—	—	—
13e, 14e	—	1	—	—	Aucune réaction.	
17e	—	1/4	—	de toxine pure.	Léger œdème, pas de fièvre.	
22e	—	1	—	—	—	—
23e	—	2 cent. cubes.		—	—	—
25e	—	3	—	—	—	—
28e	—	5	—	—	—	—
30e, 32e, 36e	—	5	—	—	—	—
39, 41e	—	10	—	—	—	—
43e, 46e, 48e, 50e	—	30	—	—	Œdème assez prononcé, dissipé en 24 heures.	
53e	—	60	—	—	—	—
57e, 63e, 65e, 67e	—	60	—	—	—	—
72e	—	90	—	—	—	—
80e	—	250	—	—	—	—

Le cheval s'immunise donc petit à petit contre des doses croissantes de toxine; il ne présente pas d'autre réaction qu'un œdème local transitoire. Il est vrai que, chez certains chevaux, cet œdème peut être dur, étendu et s'accompagner de température élevée.

Actuellement, on se sert, à l'Institut Pasteur, d'une toxine dont 1/100 de centimètre cube tue le cobaye en trente-six heures ; la vaccination des chevaux doit alors être conduite beaucoup plus prudemment.

On peut encore employer un procédé utilisé en Amérique (W. Park). Le cheval est immunisé tout d'abord par un mélange de toxine et de sérum antitoxique. Dès la troisième injection, on vaccine à l'aide de toxine pure. Cette méthode donnerait, plus rapidement que le procédé à l'iode, un sérum très actif.

Dans l'un et l'autre cas, la saignée destinée à recueillir le sérum est pratiquée une dizaine de jours après la dernière inoculation ; une saignée peut fournir 6 litres de sang, donnant 3 litres de sérum.

L'état d'immunisation des chevaux est entretenu dans la suite soit par des injections progressives de 25 à 150 centimètres cubes de toxine pratiquées tous les deux à trois jours, soit par deux seules injections de 300 centimètres cubes et, trois jours après, de 500 centimètres cubes; après quoi l'animal peut être de nouveau saigné au bout de vingt jours environ.

Propriétés du sérum. — Le sérum préparé par des injections progressives de toxine possède des propriétés agglutinantes assez restreintes, beaucoup moins marquées que celles du sérum antimicrobien; il n'est pas bactéricide et ne contient pas de sensibilisatrice pour le Bacille de Löffler. Par contre, il est *très antitoxique*.

A cet égard, il jouit d'un *pouvoir préventif* indiscutable vis-à-vis des effets nocifs de la *toxine* : on injecte à des cobayes du sérum antitoxique, puis une quantité de toxine qui fait sûrement périr l'animal de même poids en trente-six à quarante-huit heures. Alors que ce dernier succombe, les cobayes traités ne présentent aucun trouble et survivent.

Ce pouvoir préventif peut être mesuré, comme on le verra plus loin ; il dépend du poids de l'animal, de l'activité de la toxine et du sérum utilisé.

Le *pouvoir thérapeutique* peut être mis en évidence de la façon suivante : à des cobayes de même poids, on inocule tout d'abord la toxine, puis, plusieurs heures après, le sérum. Ils résistent, alors que les témoins succombent.

Ces pouvoirs préventif et thérapeutique s'exercent aussi chez les cobayes inoculés avec les *cultures vivantes de Bacille diphtérique*.

On injecte du sérum sous la peau d'un cobaye, puis on pratique une inoculation de cultures au niveau de la vulve ou de la trachée ; la fausse membrane se développe néanmoins, mais tombe au bout de quarante-huit heures ; l'animal ne présente aucun phénomène d'intoxication et survit.

Quand l'injection de sérum est pratiquée une fois que la fausse membrane s'est développée, la tuméfaction œdémateuse dont la muqueuse est le siège disparaît quelques heures après, et, au bout de quarante-huit heures, la fausse membrane se détache et tombe.

Cette action curative du sérum est beaucoup moins marquée quand au Bacille de Löffler on associe du Streptocoque.

Application à la thérapeutique humaine. — Le sérum antidiphtérique antitoxique est utilisé journellement en thérapeutique humaine. Personne n'ignore les résultats remarquables qu'il donne. La mortalité par diphtérie est beaucoup plus réduite que lors de la période antésérothérapique.

De plus, chez l'homme, le sérum jouit de propriétés préventives indéniables ; injecté à des sujets qui sont en contact avec des diphtériques, il les préserve sûrement pendant une quinzaine de jours ; pour que cette immunité passive soit plus durable, les injections doivent être renouvelées au bout de ce délai. Ces injections préventives sont employées journellement dans les salles d'enfants rougeoleux, qui, sans cette pratique, contractent fréquemment la diphtérie.

Essai du sérum. — Avant d'être livré à la consommation pour les besoins de la thérapeutique, il faut titrer le sérum. Divers procédés ont été conseillés.

Procédé de Behring. — Il titre le sérum d'après la quantité qui préserve 1 gramme de cobaye contre une dose mortelle de toxine, injectée douze heures après. Ainsi, quand 1 centimètre cube de sérum préserve 1 kilogramme de cobaye dans ces conditions, il serait actif au millième.

Procédé d'Ehrlich. — Ehrlich mesure les *unités antitoxiques*. L'unité antitoxique est la dose de sérum capable de protéger contre 100 doses mortelles de toxine, la dose mortelle étant égale à $0^{cc},1$. Si donc $0^{cc},01$ de sérum protège contre 100 doses mortelles de toxique, le sérum contient 100 unités antitoxiques par centimètre cube,

Procédé de Roux. — Pour Roux, l'unité antitoxique représente le rapport qui existe entre la quantité de sérum capable de préserver un cobaye inoculé douze heures après l'injection de sérum avec $0^{cc},5$ d'une culture virulente de Bacille diphtérique, et le poids de l'animal. Ainsi, quand $0^{cc},1$ de sérum protège un cobaye de 500 grammes, ce sérum est actif à 1/5 000.

C'est le procédé d'Ehrlich qui, actuellement, est employé dans tous les laboratoires.

Les propriétés du sérum ne s'acquièrent pas parallèlement: Martin, Momont et Loiseau ont montré qu'un sérum peut être très préventif et peu antitoxique; la réciproque est vraie. Aussi pense-t-on en général que les méthodes de Roux et d'Ehrlich se complètent mutuellement et que chacune donne des indications utiles pour apprécier à sa juste valeur le sérum antidiphtérique.

Sérum antimicrobien.

Préparation. — L. Martin a obtenu un sérum antidiphtérique non plus antitoxique, mais antimicrobien, en injectant sous la peau, dans les veines, ou dans le péritoine du cheval, une émulsion de Bacilles de Löffler chauffée à 100° pendant une heure.

Propriétés du sérum. — Ce sérum est nettement agglutinant et possède une sensibilisatrice spécifique.

Applications thérapeutiques. — L. Martin a utilisé le sérum antimicrobien dans le traitement local de la diphtérie.

Les attouchements multiples des fausses membranes diphtériques restent inefficaces. Pour bien agir, le sérum doit rester en contact assez prolongé avec la lésion.

L. Martin a imaginé d'incorporer le sérum à de la gomme sous forme de pastilles que le malade garde dans la bouche et suce presque en permanence.

Sous l'influence de ce traitement, les fausses membranes se ramollissent et se détergent assez rapidement, mais il ne saurait lutter contre la toxine en circulation dans l'organisme.

On emploie de préférence les pastilles de Martin pour faire disparaître les Bacilles diphtériques, dont la persistance est parfois

longue après la chute des fausses membranes; le malade doit sucer une pastille par heure pendant le jour, soit environ douze pastilles par jour; le plus généralement, les Bacilles de Löffler disparaissent après trois jours, au plus cinq jours (L. Martin, Dopter, etc.).

L'inhalation de poudre de sérum pour faire disparaître le Bacille des fosses nasales peut être utilisée, à raison de huit à dix prises par jour; le Bacille diphtérique disparaît en moyenne en douze jours (Dopter). On obtient des résultats analogues par l'insufflation de la poudre à l'aide d'un pulvérisateur; celui-ci sera pourvu d'un ajutage à extrémité coudée permettant d'introduire cette dernière derrière le voile du palais et de porter la poudre directement au niveau de la muqueuse rhino-pharyngée.

VACCINATION PRÉVENTIVE.

La vaccination préventive peut être mise en œuvre en conférant à l'organisme humain soit l'immunité passive, soit l'immunité active.

Vaccination par immunité passive. — Cette vaccination est obtenue par les injections préventives de sérum antidiphtérique (Voy. plus haut).

Vaccination par immunité active. — Behring tenta en 1913 des essais d'immunisation active à l'aide d'un mélange de toxine et d'antitoxine neutre ou légèrement toxique pour le cobaye, en injections sous cutanées. Les sujets à vacciner recevaient 1/20, 1/10 de centimètre cube répétés tous les sept ou dix jours. Des applications de ce procédé furent réalisées par ses élèves, mais sans grand résultat pratique.

Depuis lors, Park, Zingher et Serota utilisèrent des mélanges de toxine-antitoxine, légèrement antitoxiques pour le cobaye. Les injections étaient faites sous la peau à des intervalles de trois à sept jours, aux doses successives de 0cc,25, 1, 3, 5 centimètres cubes. Elles déterminaient une réaction locale plus ou moins marquée: rougeur, induration, sensibilité douloureuse, élévation de température de 1 à 3°. L'expérimentation fut faite sur 68 sujets, chez lesquels 5 contractèrent néanmoins une diphtérie légère.

Ces résultats prouvent que le procédé employé ne confère pas une immunité suffisante. La vaccination active se montre donc nettement inférieure à la vaccination passive.

CHAPITRE XXIX

BACILLE DE LA MORVE

Le Bacille spécifique de la morve a été découvert en 1881 par Bouchard, Capitan et Charrin, qui l'ont observé dans le pus d'un abcès provenant d'un cas de morve humaine, et ont reproduit l'infec-

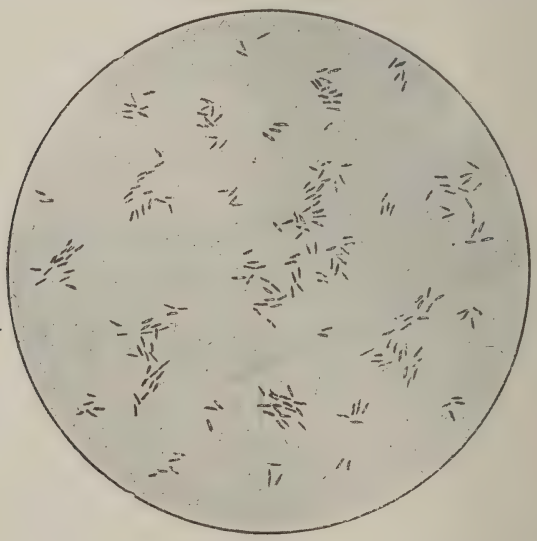

Fig. 193. — Bacille morveux provenant d'une culture sur pomme de terre.

tion expérimentale par inoculation de culture à l'âne et au cobaye. Du pus, du jetage de cheval morveux leur ont donné les mêmes résultats.

Peu après, Löffler et Schutz firent des constatations identiques, mais isolèrent le microbe en culture pure et définirent ses caractères.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — Le Bacille morveux est un bâtonnet droit ou légèrement incurvé, à extrémités arrondies, présentant les dimensions du Bacille de Koch, mais un peu plus épais (2 à 5 μ de long sur 1 μ à 1 μ,5 de large) (fig. 193). Toutefois cet aspect peut se modifier suivant le milieu qui a servi à le cultiver et l'âge de la culture. En effet, s'il est cultivé en bouillon, le bâtonnet devient plus court et prend l'aspect d'un microcoque. Il en est de même sur les cultures âgées en pomme de terre. En d'autres cas, il se dispose avec ses congénères sous forme de chaînettes (streptobacilles).

Dans les vieilles cultures, on observe des formes d'involution sous l'aspect de longs filaments à extrémités renflées, ovoïdes, piriformes, etc. ; elles peuvent même se ramifier.

Dans les tissus, il se présente souvent en amas.

Coloration. — L'affinité du Bacille de la morve pour les matières colorantes est peu marquée ; aussi faut-il utiliser les solutions mordancées telles que le bleu de Löffler, la fuchsine de Ziehl, la thionine phéniquée, le bleu de toluidine, *Il ne prend pas le Gram*. Une fois coloré, ce germe présente des granulations qui tranchent sur les espaces incolores.

Dans les nodules morveux, perceptibles dans les coupes, sa coloration est malaisée. On peut employer cependant avec succès les procédés de Kühne et de Löffler.

CULTURES.

Germe aérobie, le Bacille morveux commence à se développer à 25°, la température optima est de 37° ; à 45° la culture s'arrête ; à 55°, elle meurt.

Bouillon. — En bouillon, et de préférence en bouillon glycériné, un trouble se produit en vingt-quatre heures, sans caractère spécial ; à la longue, un léger voile se montre à la surface, avec un anneau sur les bords, puis un dépôt visqueux, blanchâtre, qui, par agitation du tube, monte en tourbillon jusqu'à la surface du liquide.

Gélatine. — Culture très grêle sur gélatine à 25° (12 ou 25 p. 100).

Gélose ordinaire. — Strie blanchâtre, semi-translucide, à bords minces, irisés, devenant opaque les jours suivants. Le pourtour est blanc grisâtre : le centre est jaunâtre et peut devenir brunâtre.

Gélose glycérinée. — Développement très abondant ; en vingt-

quatre heures se forme une bande, blanc mat, à bords transparents.

Sérum coagulé. — Les colonies se montrent sous forme de gouttelettes légèrement jaunâtres, parfois brun fauve, demi-transparentes, de consistance visqueuse.

Fig. 194. — Culture de Bacille morveux sur pomme de terre (cinquième jour).

Pomme de terre. — Dès le deuxième jour, apparaît une glaire mince, jaunâtre, transparente, devenant ambrée le lendemain; puis, après cinq à six jours, la culture devient opaque, visqueuse et se colore en brun rougeâtre (fig. 194). De plus, la zone environnant la culture devient verdâtre ou brunâtre. Cet aspect est constant et caractéristique.

Lait. — On observe la coagulation du lait vers le dixième ou douzième jour; elle se produit sous l'influence d'une présure et non d'un acide, car le milieu conserve une réaction neutre.

CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Virulence. — Le Bacille morveux n'offre qu'une résistance faible aux agents extérieurs. Dans les cultures, le temps de conservation est très restreint. M. Nicolle le conserve cependant assez longtemps en tubes scellés à la glacière.

Il est très sensible à la chaleur ; il suffit d'un chauffage pendant cinq minutes à 55° pour le détruire. S'il est inclus dans le pus, il succombe en cinq minutes à la température de l'ébullition. Le pus morveux exposé pendant vingt-quatre heures à la lumière perd ses propriétés pathogènes. La dessiccation n'est favorable à sa conservation que s'il est inclus dans le sang ou le pus.

Les antiseptiques usuels le tuent en quelques minutes. Le crésol, le chlorure de chaux, le lait de chaux en ont rapidement raison.

Sur les cadavres, il résiste peu à la concurrence vitale créée par les bactéries de la putréfaction.

Les cultures récentes sont très virulentes, et leur manipulation est particulièrement dangereuse. Après un séjour d'une semaine à l'étuve à 37°, la virulence disparaît souvent. Enfin les passages par l'animal l'exaltent à un haut degré.

Pouvoir toxique. — Formation de la malléine. — Quand

on injecte à un animal une culture de Bacille morveux virulent, tué à 100°, il succombe rapidement. Par conséquent, en culture, ce germe fabrique des produits toxiques, qu'on a assimilés à une toxine ; celle-ci peut encore être mise en évidence dans les filtrats de cultures entières. Ils sont en effet très toxiques pour les animaux réceptifs, chez lesquels ils produisent une cachexie progressive très rapide.

Les produits toxiques constituent ce que l'on nomme la *malléine*, étudiée par Helman et Kalming, puis Roux et Nocard.

Préparation de la malléine. — E. Roux ensemence en bouillon glycériné à 5 p. 100, dans des ballons très aérés, du Bacille morveux dont la virulence a été exaltée par plusieurs passages sur le lapin, en inoculation intraveineuse. Il est préférable d'ensemencer directement le sang du dernier lapin injecté. On porte à l'étuve à 37°, où la culture séjourne un mois. On la chauffe alors à 100° pendant une demi-heure : le liquide est alors concentré au bain-marie jusqu'au dixième de son volume ; on filtre sur papier Chardin. Le filtrat obtenu est sirupeux et présente une teinte brun rouge. C'est la malléine brute.

On prépare de la malléine sèche, en l'additionnant de 20 à 30 fois son poids d'alcool absolu (Foth). Le précipité blanc qui se forme constitue la malléine sèche.

Babès prépare la malléine de la façon suivante : On cultive le Bacille morveux en pâte de pomme de terre glycérinée ; après un séjour de cinq à six semaines à l'étuve à 37°, émulsionner dans l'eau, filtrer, précipiter par l'alcool à 95°. Après lavage à l'alcool et à l'éther, dessécher. On obtient une poudre dont l'activité dure plus de trois ans.

En Autriche, Snurer soumet les Bacilles virulents à l'action d'un mélange d'eau de Javel, d'ammoniaque et d'antiformine, qui les dissout. Neutraliser par l'acide sulfurique et précipiter par l'alcool absolu. Le précipité serait une malléine très toxique, mais moins active en réalité que celle de Roux.

Injection à l'animal. — La malléine brute, injectée au lapin à la dose de 1 centimètre cube, tue cet animal. Injectée dans le péritoine de cobayes sains, elle est inoffensive ; mais, chez des cobayes morveux, elle amène la mort en quatre à cinq jours (M. Nicolle).

Si on l'emploie à très faible dose (dilution à 1 p. 10), l'injection sous-cutanée de trois quarts de centimètre cube n'est suivie, chez un *cheval normal* ou atteint d'une affection étrangère à la morve, d'aucun phénomène morbide. Si elle est pratiquée au contraire chez un *cheval atteint de morve avérée ou latente*, elle détermine des symptômes réactionnels : au point d'inoculation apparaît, quelques heures après, un œdème considérable avec engorgement lymphatique et ganglionnaire dans le territoire injecté ; puis se produisent des frissons, de la fièvre (0°,5 à 3° au-dessus de la normale). Ces

troubles, accompagnés de prostration marquée, durent deux à trois jours.

On verra plus loin le parti que Nocard a tiré de cette réaction pour le diagnostic de la morve.

Agglutination. — Bourges et Méry, Mac Fadyen, etc. ont montré que le Bacille morveux, agglutinable à 1 p. 100 par le sérum des chevaux sains, présentait cette réaction à des taux beaucoup plus élevés avec le sérum de chevaux morveux.

L'épreuve de l'agglutination s'effectue de la façon suivante: dans un mortier on broie des Bacilles morveux desséchés, recueillis sur pomme de terre ou gélose glycérinée ; on les émulsionne dans l'eau physiologique, de manière à obtenir une couche très homogène ; laisser reposer, verser dans les tubes le liquide décanté, et des dilutions décroissantes de sérum. Porter à l'étuve pendant vingt-quatre heures. La réaction doit être déclarée positive dans les tubes où le liquide s'est complètement éclairci.

Les sérums normaux donnent une agglutination qui n'excède pas 1 p. 300 ; celui des animaux morveux agglutine facilement à 1 p. 1000, 1 p. 5000 et même 1 p. 10 000.

On s'accorde à penser que cette réaction consiste beaucoup plus en une précipitation qu'en une agglutination véritable, cette dernière ne s'effectuant qu'avec des bactéries entières et intactes.

Précipitation. — Plusieurs auteurs ont prétendu que l'addition de sérum de cheval morveux à une dilution de malléine provoquait la formation d'un précipité spécifique, dont l'utilité pour le diagnostic serait indiscutable (Wiesner). D'autres ont contesté les résultats de cette méthode, car le sérum de cheval normal peut être naturellement précipitant. Cependant, d'après Scotti, le précipité obtenu avec le sérum normal disparaît spontanément après dix-huit à vingt heures, alors qu'à cette période le précipité spécifique est à son maximum.

Fixation du complément. — Il en serait de même de la fixation du complément, qui peut s'obtenir parfois avec des sérums normaux.

Conglutination globulaire. — Réaction sérique imaginée par Pfeiler et Weber, grâce à laquelle les hématies lavées de moutons sont agglutinées par le sérum normal inactivé de bœuf, en présence de sérum frais de cheval. Si le sérum utilisé provient d'un animal atteint d'une infection étrangère à la morve, on observe la formation d'un caillot bien cohérent (conglutination). Si le sérum provient d'un animal morveux, la conglutination ne se produit pas. Il s'agit, en somme, d'une réaction de fixation du complément dont le témoin est une agglutination, au lieu d'être une hémolyse.

Cette propriété de l'extrait morveux d'empêcher la conglutination globulaire apparaît le sixième ou septième jour après l'infection expérimentale.

D'après un certains nombre d'auteurs, cette réaction serait plus sensible que celle de la fixation du complément, et n'exigerait que 0cc,05 de sérum pour être perceptible.

HABITAT ET MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES.

La morve s'observe surtout chez l'animal, et plus particulièrement sur les équidés, qui, en certains cas, peuvent la communiquer à l'homme.

Le Bacille morveux est responsable de toutes les manifestations pathologiques de l'infection morveuse ; il provoque : 1° le *farcin*, aigu ou chronique, consistant en abcès cutanés ou boutons farcineux, s'ulcérant sous forme de chancres, en lymphangites, formant des cordons lymphatiques moniliformes allant jusqu'aux ganglions les plus proches qui s'hypertrophient (glandage) ; 2° la *morve* proprement dite, c'est-à-dire des lésions des fosses nasales, des poumons, puis de tous les viscères. En ce cas, il détermine, dans les parenchymes atteints, des nodules assez analogues à des tubercules miliaires, translucides, mais à centre opaque et subissant comme eux la caséification.

Dans toutes ces lésions, qu'elles évoluent chez l'homme ou l'animal, se trouve en plus ou moins grande abondance le Bacille de la morve. Il siège dans le pus des ulcérations, des chancres, des boutons, des abcès, dans le jetage, les ganglions, enfin dans les nodules. Dans les ganglions et les lymphatiques, il se trouve en grand nombre. Il est rare dans le sang des animaux morveux, même chez l'âne, dont la morve prend une allure galopante ; au contraire, chez l'homme, on le rencontre assez fréquemment (Löffler, Siltmann). La sueur, la salive, l'urine sont parfois virulentes ; on a signalé sa présence dans le suc musculaire ; cette éventualité, assez rare, expliquerait les cas d'infection morveuse contractée par ingestion.

Dans les viscères, foie et rate en particulier, il détermine de minuscules foyers blanchâtres, gros comme la pointe d'une aiguille.

INFECTION MORVEUSE EXPÉRIMENTALE.

Homme. — Plusieurs bactériologistes ont contracté la morve par inoculation accidentelle en maniant des cultures de Bacille morveux. Elle prend alors le caractère septicémique. L'homme est donc très

réceptif au virus morveux. Quand elle est contractée par contact avec un animal, elle prend le type chronique.

Équidés. — Les solipèdes (âne, mulet, cheval) sont doués d'une grande réceptivité vis-à-vis de l'infection expérimentale ; l'âne est le plus réceptif.

Chez l'*âne*, il suffit de frictionner à l'aide d'un produit morveux quelques scarifications effectuées sur le front.

Tout d'abord, les plaies se referment, puis à leur niveau apparaît un gonflement, puis un chancre; la morve prend alors un caractère aigu, présentant beaucoup d'analogie avec une granulie. L'animal succombe en peu de jours. L'autopsie montre des boutons morveux développés sur la muqueuse nasale, le larynx et la trachée : au niveau des poumons et souvent des autres viscères, on perçoit comme des infarctus de teinte blanc sale, rappelant l'aspect d'une tumeur. La pression latérale de ces productions fait sourdre des gouttelettes caséeuses riches en Bacilles morveux (fig. 195).

Le *cheval* et le *mulet*, infectés d'une façon identique, présentent une forme subaiguë ou chronique.

Cobaye. — Le cobaye est un réactif très sensible à l'inoculation de produits morveux ou de cultures du Bacille spécifique. Il est très utilisé pour le diagnostic de la morve équine ou humaine.

Injection sous-cutanée. — L'injection sous-cutanée détermine au point d'inoculation la formation d'un abcès qui s'ouvre bientôt, suivi de lymphangite et d'adénite qui peut suppurer ; puis des nodules se développent dans la rate et le foie, des abcès se forment dans les testicules ; enfin, au bout de cinq à six semaines, l'animal, très amaigri, finit par succomber.

Injection cutanée. — L'inoculation par scarification donne lieu aux mêmes lésions.

Injection intrapéritonéale. — Si l'injection est pratiquée chez un mâle adulte, on voit évoluer, deux à trois jours après, un véritable *sarcocèle morveux* ; les testicules présentent un gonflement énorme et ne peuvent être refoulés dans l'abdomen ; le scrotum est tendu, luisant, rouge ; à son niveau un abcès s'ouvre, donnant issue à du pus chargé de Bacilles morveux (fig. 196). L'animal succombe en huit à dix jours.

L'autopsie montre la vaginale tuméfiée, parsemée de granulations, souvent recouverte d'un exsudat louche, purulent.

Les cobayes femelles, de même âge et de même poids, résistent à l'inoculation péritonéale. Il en est de même des cobayes très jeunes et des cobayes préalablement castrés. Ces derniers résistent à 100 doses mortelles.

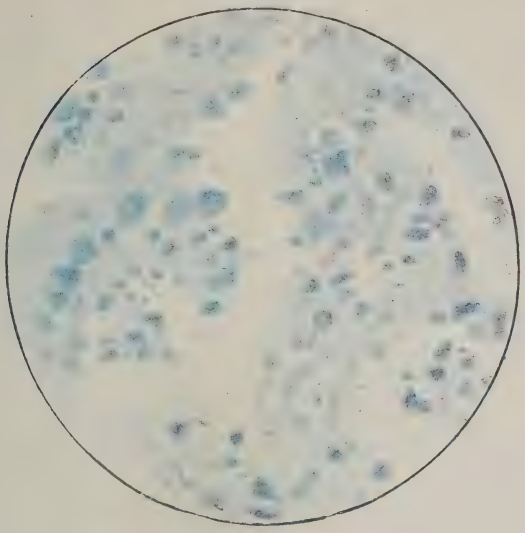

Fig. 195. — Bacilles morveux dans un nodule développé dans le poumon d'âne

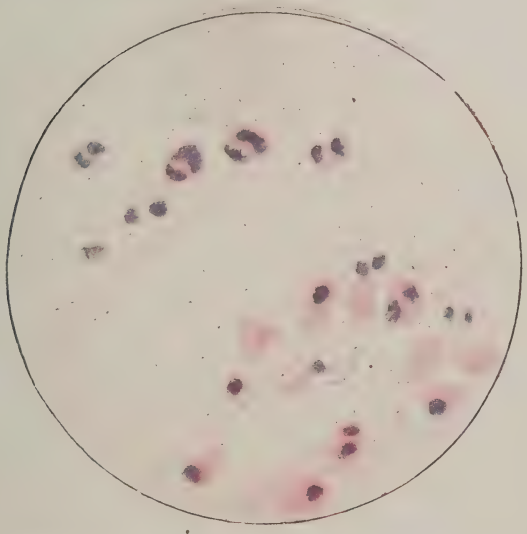

Fig. 196. — Frottis de pus de testicule morveux. — Bacilles morveux décolorés par le Gram.

D'après Straus, qui l'a fait connaître (*signe de Straus*), cette orchite morveuse expérimentale serait caractéristique et pourrait servir de pierre de touche pour le diagnostic. On a reconnu dans la suite que d'autres germes peuvent donner cette lésion : le Bacille pyocyanique, le *M. melitensis*, le *Sporotrichum Beurmanni*, etc.

Nocard a pu la déterminer avec un bacille tout différent, provenant d'une lymphangite ulcéreuse d'apparence farcineuse, observée chez le cheval. Le sarcocèle ne peut donc être considéré comme la signature du Bacille morveux.

Autres animaux. — Les *bovidés* sont réfractaires. Les *ovidés* (mouton, chèvre) contractent facilement la morve après l'inoculation sous-cutanée de produits virulents.

Certains *carnassiers*, le lion, le tigre, le léopard, contracteraient facilement la morve par ingestion de viande d'animaux morveux.

Le *chien* est peu sensible ; la morve se montre sous la forme de lésions cutanées qui guérissent spontanément. Seul le jeune chien présente une forme aiguë avec généralisation.

Le *chat* est facilement infectable : après un ulcère au point d'inoculation, l'infection se généralise.

Le *lapin* est assez réfractaire. Le chancre déterminé par inoculation cutanée guérit spontanément. Pour tuer cet animal, il faut utiliser l'injection intraveineuse.

Le *porc*, les *rats* et les *souris* sont peu résistants.

Léo a montré que la souris devient réceptive quand on lui confère le diabète phlorizinique.

Enfin, contrairement à la souris domestique et à la souris blanche, le campagnol et le mulot sont réceptifs.

Les *oiseaux* sont totalement réfractaires.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA MORVE.

Recherche du Bacille morveux dans l'organisme. — *Examen microscopique direct.* — Recueillir le pus, le jetage, etc., ou les sucs d'organes (ganglions, rate, etc.); en faire des frottis sur lame. Colorer par les solutions simples et par le Gram. On sait que le Bacille morveux ne prend pas le Gram. On peut utiliser des fragments d'organes prélevés à l'autopsie pour en faire des coupes.

En réalité, l'examen direct donne rarement des résultats suffisants. A côté des cas où les Bacilles sont abondants, il arrive fréquemment que ces derniers soient très rares et passent facilement inaperçus. Il faut donc, le plus souvent, recourir à la culture pour le mettre en évidence, l'isoler et l'identifier.

Cultures. — Ensemencer le produit suspect sur *pomme de terre*, qui constitue le milieu de choix. Pour obtenir des colonies isolées, il est bon d'ensemencer sans recharger l'öse, sur plusieurs pommes

de terre. A côté d'impuretés, on verra se développer ainsi les colonies de Bacille morveux avec leur aspect et leur teinte caractéristique.

Inoculation au cobaye mâle. — Straus recommandait, pour avoir un diagnostic rapide, d'inoculer directement le produit suspect dans la péritoine d'un cobaye mâle pour déterminer l'orchite morveuse. La pratique a montré qu'en pareil cas le Bacille spécifique est mêlé souvent à des souillures microbiennes qui tuent l'animal par péritonite septique et masquent l'infection morveuse.

Pour éviter cet inconvénient, on conseille d'inoculer tout d'abord un cobaye sous la peau; puis, quand les ganglions s'engorgent, on les prélève pour les introduire dans le péritoine d'un autre cobaye, qui présente ensuite les symptômes et les lésions habituels de la morve, avec le sarcocèle.

Rappelons que l'orchite n'est pas pathognomonique de l'infection morveuse. Sa constatation doit toujours être complétée par l'examen du pus.

Réactions à la malléine. — Chez l'animal, le diagnostic de la morve, même latente, par l'épreuve de la malléine, est entré dans la pratique courante.

Le cheval que l'on veut malléiner est mis en observation pendant deux jours; sa température est prise matin et soir.

Après cette période, on pratique une *injection sous-cutanée* (*sous-cuti-réaction*), au niveau de l'encolure, de 2cc,5 de la dilution suivante : malléine brute, 1 partie; aide phénique à 5 p. 100, 9 parties.

La température est prise trois fois en vingt-quatre heures. Rappelons que l'animal indemne de morve ne présente aucune réaction. S'il est atteint de morve, avérée ou latente, l'œdème local apparaît, et la température s'élève huit ou dix heures après, pour ne prendre fin que vers la cinquantième heure.

Quand l'animal est atteint de lésions trop accusées, la réaction ne se produit pas.

La méthode est inutilisable chez l'homme en raison de l'intensité de la réaction qu'elle provoque. Chez l'animal, son application, en permettant de faire des diagnostics précoces sur des animaux ne présentant encore ni jetage, ni aucune lésion apparente, a rendu les plus grands services au point de vue prophylactique.

Plusieurs auteurs ont tenté d'appliquer au diagnostic de la morve les procédés employés pour la tuberculose : *cuti-réaction*, *ophtalmo-réaction*. De l'avis de tous, Vallée entre autres, ces pratiques donnent des résultats inconstants, ne valant pas ceux que fournit

la sous-cuti-réaction. L'ophtalmo-réaction, cependant, est devenue réglementaire en Autriche.

Sérodiagnostic. — Le sérodiagnostic peut être recherché par plusieurs méthodes.

1° *Agglutination.* — L'agglutinabilité des cultures de Bacille morveux par le sérum des sujets atteints de morve pouvait faire songer à la possibilité d'établir un diagnostic par la séro-réaction. Le sérodiagnostic peut, en effet, donner des indications utiles. Mais, en raison des propriétés agglutinantes à 1 et même 3 p. 100 du sérum des animaux normaux, l'épreuve ne saurait être faite à un taux inférieur à 5 p. 100. Heanby, puis Courmont ont fait des observations identiques pour le sérum des hommes sains et atteints de morve.

2° *Réaction de fixation du complément.* — Elle s'effectue par le procédé classique; elle donne souvent des résultats infidèles.

3° *Epreuve de la conglutination.* — On met en présence :

a. de l'alexine (sérum frais de cheval);

b. le sérum à étudier, chauffé à 56° ;

c. un extrait de Bacilles morveux (malléine) ;

d. du sérum chauffé de bœuf (conglutinine) ;

e. une émulsion de globules rouges de mouton lavés.

Si l'on n'observe aucune conglutination globulaire, la réaction est positive, et le sérum suspecté provient d'un animal morveux.

Il est juste d'ajouter que les résultats fournis par cette méthode sont contestés par certains auteurs.

Précipito-réaction. — Mettre en présence le sérum à étudier et de la malléine. Observer la production du précipité. Tenir compte de la persistance de l'anneau de précipitation à la limite des deux produits; se rappeler que si l'anneau disparaît après dix-huit à vingt heures, il s'agit d'une précipitation non spécifique ; si à ce moment, il est à son maximum, la réaction peut être considérée comme positive (Scotti).

IMMUNITÉ. — VACCINATION.

Les documents que l'on possède concernant l'immunité morveuse sont rares.

On s'accorde en général à penser qu'une atteinte de morve guérie ne confère pas l'immunité. Ainsi Galtier a pu inoculer cinq fois la morve chez un même chien, animal cependant assez résistant. Il est vrai que les symptômes furent de moins en moins intenses.

Straus cependant a vacciné un chien contre les effets de l'inocu-

lation massive intraveineuse par inoculation de vieilles cultures sous la peau.

M. Nicolle a pu obtenir l'immunité chez le cobaye en le vaccinant de différentes manières ; il a utilisé comme vaccin des Bacilles tués par l'alcool-éther, puis des microbes vivants à dose inoffensive ; avec ces deux procédés, de nombreuses inoculations sont nécessaires ; enfin il a obtenu l'immunité par une seule injection de microbes vivants à dose infectante, mais telle que l'animal en guérit. Ce dernier procédé est le plus efficace.

Les essais d'immunisation passive par injection de sérum de bovidés (réfractaires à la morve) sont restés sans résultat.

CHAPITRE XXX

BACILLE DU ROUGET DU PORC

Le rouget du porc est une infection qui se révèle par l'apparition de taches purpuriques siégeant sur les téguments, aux oreilles, dans la région anale et vulvaire, et au groin : il présente en même temps de la diarrhée,

Fig. 197. — Culture de rouget du porc en bouillon.

de la fièvre. Dans les porcheries où l'infection règne, 50 p. 100 des animaux atteints succombent en deux à trois jours. Dans une forme chronique, les phénomènes sont moins bruyants, puis l'animal présente une tuméfaction des jointures qu'on a dénommée « goutte » ; on observe de la desquamation au niveau des taches purpuriques : enfin la guérison est assez fréquente.

Le rouget du porc est causé par un Bacille spécial, découvert par Pasteur et Thuillier dans le sang des porcs atteints de cette affection. Il a été bien étudié par Löffler.

MORPHOLOGIE.

Aspect microscopique. — Le germe spécifique du rouget est un bacille fin (fig. 197) de petites dimensions (1 μ environ de long sur 0 μ,2 de large). Vu à l'état frais dans les cultures ou les produits pathologiques, il est immobile. Dans le sang et les tissus, ses éléments sont isolés ou groupés par deux. Dans les cultures en bouillon, il se groupe avec ses congénères sous forme de chaînettes.

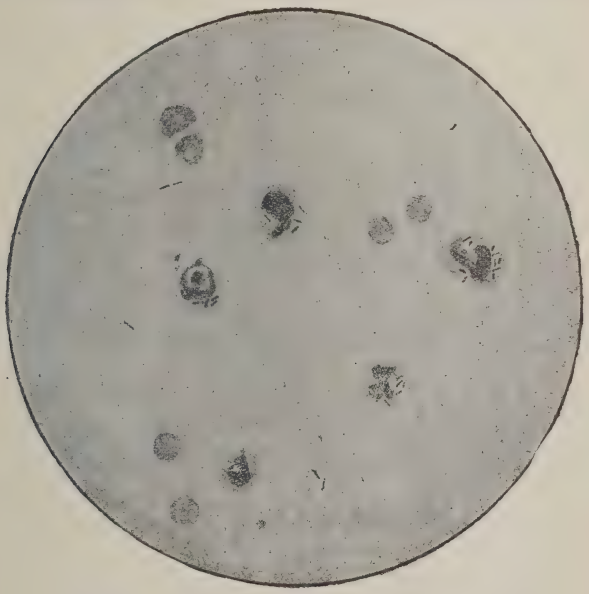

Fig. 198. — Bacilles du rouget du porc dans un viscère.

Dans la pulpe des viscères et dans les coupes, ils sont souvent sous l'aspect d'amas et facilement englobés dans les leucocytes.

Coloration. — Il fixe bien toutes les couleurs d'aniline. *Il prend le Gram.*

CULTURES.

Il pousse indifféremment en vie aérobie ou anaérobie, mais il préfère l'anaérobiose ; ses cultures sont habituellement grêles.

Bouillon. — Le bouillon se trouble légèrement; une secousse imprimée au tube provoque la formation d'ondes moirées; vers le quatrième jour, un précipité blanchâtre se dépose au fond du tube.

Gélatine. — *En piqûre*, la culture est caractéristique : elle se développe de préférence dans les parties profondes peu aérées du culot de gélatine. Au bout de quelques jours, au niveau de la ligne d'ensemencement, se développent des colonies confluentes et opaques d'où se détachent des rayons ou des houppettes, dont l'ensemble figure un « rince-bouteille ».

Mais, après une vingtaine de jours, cet aspect perd sa netteté; la culture diffuse dans toute l'épaisseur de la gélatine. Celle-ci ne subit aucune liquéfaction.

Les *colonies isolées* figurent des flocons d'où partent des filaments ramifiés. Plus tard, la colonie prend un aspect flou et est réduite à l'état d'une tache brunâtre.

Gélose. — La strie prend tout d'abord un aspect rayonné, puis devient complètement homogène.

Pomme de terre. — Culture nulle en aérobie; en anaérobie, elle est à peine perceptible.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Vitalité. — Conservées en anaérobiose, les cultures du germe en question peuvent vivre pendant six mois : à cette époque, la virulence, bien qu'atténuée, existe toujours. Mais, dans les cultures aérobies, le Bacille succombe en quinze à vingt jours.

Virulence. — La virulence peut s'atténuer par un séjour prolongé dans les milieux de culture.

L'atténuation s'obtient encore de la façon suivante : on effectue plusieurs passages par le lapin; un virus qui a subi cette épreuve possède une virulence renforcée pour le lapin, mais diminuée pour le porc. Au contraire, quand les passages en série sont effectués chez le pigeon, la virulence est accrue pour tous les animaux réceptifs.

Agglutinabilité. — Le Bacille du rouget du porc est agglutiné à des degrés variables par le sérum des animaux préparés par injections de cultures virulentes.

Fixation du complément. — Bordet et Gengou ont démontré que le sérum des animaux vaccinés contient une sensibilisatrice spécifique pour ce germe pris comme antigène.

Produits toxiques. — Une culture filtrée est toxique pour l'animal.

ACTION PATHOGÈNE EXPÉRIMENTALE.

Le Bacille du rouget est très pathogène pour les animaux de laboratoire : lapin, souris, pigeon; par contre, le cobaye est totalement réfractaire.

Inoculé sous la peau, le *lapin* succombe souvent en deux à cinq jours. Parfois, cependant, il présente des accidents à caractère chronique : amaigrissement, paraplégie, etc., qui ne comportent aucune gravité.

L'injection intraveineuse est plus sévère.

La *souris* est tuée par inoculation sous-cutanée en un à six jours, suivant l'activité du virus.

Le *pigeon* qui a reçu de la culture sous la peau ou de préférence dans le muscle pectoral meurt en deux à trois jours.

Le *porc*, si sensible à l'infection spontanée, l'est moins à l'infection expérimentale. Les inoculations sous-cutanées et même intraveineuses peuvent rester sans effet; l'inoculation par les voies digestives paraît plus sévère. Il est ainsi facile d'infecter un porc en lui faisant avaler des organes d'animaux atteints de rouget, ou bien des aliments souillés par leurs déjections.

Les symptômes observés sont ceux du rouget contracté spontanément. A l'autopsie, les lésions portent principalement sur la rate, qui est tuméfiée et diffluente ; les ganglions sont rouges et congestionnés; le foie est hypertrophié. Le sang est noir et à caractère asphyxique,

Le Bacille du rouget se rencontre en petite quantité dans le sang ; on le trouve surtout dans les leucocytes, où il peut se montrer en grande abondance.

Il pullule et foisonne surtout dans la rate, qui en contient un nombre considérable; avec les ganglions et la moelle osseuse, elle constitue le lieu d'élection du bacille; les frottis de rein et de foie le montrent en assez grande abondance. L'examen des coupes de tous les viscères le fait percevoir nettement.

La pénétration des Bacilles se fait par l'intestin au niveau des glandes lymphatiques ; ils gagnent ensuite les ganglions et la rate, puis diffusent à la fois par les voies sanguine et lymphatique. C'est d'ailleurs ainsi que s'effectue l'infection par les voies naturelles.

L'infection expérimentale peut être réalisée encore par les voies respiratoires (inhalation ou injection intra-trachéale de matières virulentes). Il est peu vraisemblable que ce mode de contamination puisse être observé dans les conditions ordinaires, en raison de la rapidité avec laquelle le virus perd sa vitalité.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION.

La recherche du Bacille du rouget du porc est facile. Il suffit d'effectuer des frottis et des cultures à l'aide du sang, de la pulpe des différents organes.

On colore les frottis par la méthode de Gram, et les cultures sont effectuées en milieux ordinaires et surtout en gélatine, qui donnent l'aspect caractéristique décrit plus haut.

Le diagnostic peut s'effectuer par les effets de l'inoculation au lapin, à la souris, ou au pigeon.

Voici comment, d'après Nocard et Leclainche, il est nécessaire de procéder :

Sur une coupe fraîche de foie, de rate, de ganglion, on racle une petite quantité de pulpe de l'organe; on la broie dans un mortier où on la dilue dans un peu d'eau physiologique stérile. Filtrer sur un linge fin; ce liquide filtré, aspiré dans une seringue, est injecté à la dose de 2 à 3 gouttes dans les muscles de la cuisse d'un lapin et d'un cobaye et dans le muscle pectoral d'un pigeon. Ces inoculations permettront de distinguer le rouget de la pneumo-entérite du porc avec laquelle il peut être confondu.

Si le rouget est en cause, le pigeon succombe certainement en 3 à 5 jours; le lapin meurt en général du 4e au 8e jour; le cobaye survit.

Si au contraire il s'agit de pneumo-entérite, le cobaye succombe, comme le lapin, en 3 à 8 jours, et le pigeon résiste (à la dose employée).

La détermination du germe à l'aide des propriétés biologiques précédemment décrites : agglutination et fixation du complément achève de caractériser le germe spécifique.

VACCINATION.

Par les virus atténués. — Pasteur et L. Thuillier avaient observé qu'un porc guéri d'une première atteinte de rouget était immunisé vis-à-vis d'une atteinte ultérieure. Ils eurent l'idée de conférer l'immunité à ces animaux, en pratiquant la vaccination artificielle par des cultures atténuées. Ils calquèrent la méthode sur celle de la vaccination charbonneuse.

L'infection atteignant de préférence les porcs adultes, on vaccine de préférence les sujets jeunes, âgés de deux à quatre mois, qui sont moins réceptifs. On leur inocule sous la peau tout d'abord un *premier vaccin*; il consiste en une culture en bouillon atténuée par un séjour prolongé à l'étuve (un huitième de centimètre cube, par exemple); quinze jours après, ils reçoivent le *second vaccin* (un huitième de centimètre cube), culture moins atténuée ayant subi un moins long séjour à l'étuve.

Douze jours après la deuxième vaccination, l'animal peut être

considéré comme vacciné; l'immunité dure un an environ.

L'application de cette méthode a été faite sur de nombreux animaux, en Hongrie, notamment; elle a contribué à abaisser dans des proportions importantes la morbidité et la mortalité dues au rouget, témoin les faits suivants :

En *France*, de 1890 à 1900, alors que les porcs non vaccinés donnaient un déchet de 20 p. 100, la perte chez les vaccinés ne s'élevait qu'à 1,68 p. 100.

En *Hongrie*, de 1884 à 1894, 1 085 686 porcs furent vaccinés; on n'observa que 0,75 p. 100 de perte : 0,14 après la première vaccination, et 0,07 après la seconde.

En *Russie*, d'après Kowaleski, en 1895, la perte ne s'éleva qu'à 0,04 p. 100.

Par les produits toxiques. — Lorenz vaccine des porcs par injection de cultures liquides stérilisées; d'après lui, une seule injection de 3 à 7 centimètres cubes, suivant la taille de l'animal, lui confère l'immunité. D'après Töpper cependant, cette méthode ne donnerait qu'une immunité très passagère.

Par sérum-virus. — Leclainche effectue sur les porcs une vaccination mixte : dans une première vaccination, il injecte, suivant le poids de l'animal, 5 à 10 centimètres cubes d'antisérum, mélangés au moment du besoin à un demi-centimètre cube de culture. Douze jours après, il injecte le virus seul, sans sérum. Leclainche n'a eu qu'à se louer de cette nouvelle méthode.

SÉROTHÉRAPIE.

L'idée d'une sérothérapie dirigée contre le rouget revient à Emmerich et Mastbaum.

Ces auteurs démontrèrent en 1891 que le sérum de lapins, vaccinés par injections successives de cultures diluées, possédait des propriétés préventives et curatives vis-à-vis de l'infection du lapin et de la souris.

L'injection de suc musculaire filtré sur bougie Chamberland effectuée chez le lapin développe les mêmes pouvoirs dans le sérum de cet animal.

En 1893, Lorenz éprouve le sérum obtenu chez les porcs vaccinés, puis ayant subi trois à quatre injections de 10 centimètres cubes de cultures virulentes. Il lui reconnaît un pouvoir préventif assez faible. Ce pouvoir préventif peut être accru en injectant tout d'abord du sérum, puis, douze jours après, une culture virulente sous la peau, enfin, dix jours après cette dernière, une culture virulente dans les veines.

En 1897, Leclainche vaccine des chevaux avec des cultures. Il leur injecte tout d'abord, par la voie veineuse, 50 à 100 centimètres cubes de culture en bouillon de veau, puis tous les huit jours 100 et même 300 centimètres cubes. Traité ainsi pendant deux mois environ, le cheval fournit un sérum dont 1 centimètre cube protège le pigeon contre l'action pathogène de 0cc,5 de culture virulente, injectée simultanément ou vingt-quatre heures après. De plus il agit efficacement à titre curatif chez les animaux qui le reçoivent plusieurs heures après l'inoculation microbienne.

Mesnil a démontré que ce sérum, qui n'est pas bactéricide, mais agglutinant, agit en excitant l'activité phagocytaire.

PRESERVATION REVIEW
5/05

G. E. Stechert & Co.
Alfred Hafner
New York

UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA

3 0112 072535773